

**ALESSANDRA EMY HAMASAKI**

**Avaliação da atividade nefrotóxica das toxinas recombinantes  
dermonecróticas LiRecDT1 do veneno da aranha-marrom *L. intermedia* e  
LgRec1 do veneno de *L. gaucho***

**CURITIBA  
2015**

**ALESSANDRA EMY HAMASAKI**

**Avaliação da atividade nefrotóxica das toxinas recombinantes  
dermonecróticas LiRecDT1 do veneno da aranha-marrom *L. intermedia* e  
LgRec1 do veneno de *L. gaucho***

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Biologia  
Celular e Molecular, Departamento de Biologia  
Celular, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná, como parte  
das exigências para obtenção de título de  
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga  
Co-orientadora: Profa. Dra. Olga Meiri Chaim

**CURITIBA  
2015**

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

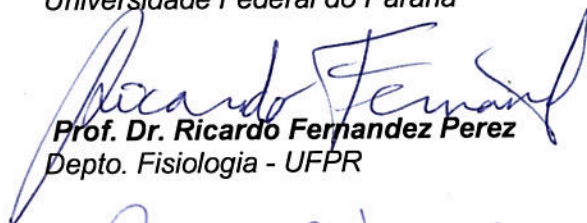
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

## PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



**Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga**  
Orientador e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná



**Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez**  
Depto. Fisiologia - UFPR



**Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer**  
Depto. Bioquímica - UFPR

### Suplente:

**Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade**  
Depto. Biologia Celular - UFPR

Após arguir a mestrandia **Alessandra Emy Hamasaki**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Avaliação da atividade nefrotóxica das toxinas recombinantes dermonecroticas LiRecDT1 do veneno da aranha-marrom *L. intermedia* e LgRec1 do veneno de *L. gaucho*", são de parecer favorável à Aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Março de 2015

Ao meu pai, à minha mãe e à minha irmã, a quem confio todo o meu amor e o meu bem. Vocês são o maior tesouro que eu tenho na vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela companhia em momentos difíceis, pelo apoio incondicional e pelo presente que é a vida.

Ao meu pai e à minha mãe. Por me amarem ao seu modo, mas acima de tudo, incondicionalmente. Pelo fato de não medirem esforços para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos. E por estarem sempre ao meu lado e sempre juntos.

À minha irmã Andréa. Tão parecidas e tão diferentes. Quero você sempre ao meu lado, companheira para a vida inteira. Grande ouvinte, mas dura quando deve ser. Ótimos momentos que ficam na lembrança, mas a certeza de que momentos ainda melhores estão em nossos caminhos. Minha melhor amiga e minha irmã.

Aos meus avôs e avós, que viveram em tempos tão diferentes, tempos em que a emoção era mais contida, tempos de muito trabalho, mas que sempre sonharam sonhos tão atuais. Sonharam com a educação, prezaram pela família e foram pessoas honestas e trabalhadoras. Tenho orgulho dessa tradição. Espero retribuir esse presente, deixando-os orgulhosos de mim.

À Gabriela, Ronile, Simone, Vanessa, Marcela, Larissa, Giovanna, Suellen, Rubia, Gisele e Ana Cláudia pela amizade. Uma palavra que define algo tão essencial na minha vida. Vocês são mais do que amigas, são minha família. O tempo já provou que esse grande laço não se rompe jamais. Crescemos juntas, e seguiremos juntas.

Ao Danilo, meu meio-irmão e grande amigo. Obrigada pelo apoio, pela amizade e pela companhia em todos os momentos. Obrigada por querer sempre o meu bem e estar de braços abertos quando precisei.

Ao meu orientador Dr Silvio Sanches Veiga pela oportunidade de realizar esse projeto e por me deixar fazer parte da equipe que compõe o laboratório. Obrigada pelos ensinamentos e pela dedicação à ciência e à educação.

À minha co-orientadora Dra Olga Meiri Chaim pelas idéias compartilhadas, pela disposição e paciência. Obrigada pela orientação, conselhos e ajuda em todo o trabalho desenvolvido.

À Marianna Boia pela grande amizade e por não medir esforços em me ajudar. Pelos ensinamentos técnicos e científicos, mas principalmente por me entender e estar sempre ao meu lado todos esses anos. Aprendi com você grandes ensinamentos de vida, e só tenho a agradecer por ter você sempre presente na minha vida.

Ao Thiago Veloso por me mostrar com simples palavras o lado que muitas vezes não nos permitimos enxergar. Por ter me aconselhado e assim, definido o meu futuro de uma forma tão positiva. A minha conquista é o resultado das suas palavras.

Aos meus afilhados, Gustavo e Gabriel. Sempre alegres e que serão aos meus olhos eternas crianças.

À Dilza Trevisan e Fernando Matsubara, a quem sempre pedi conselhos e que estavam dispostos a me ajudar e contribuir com opiniões e discussões construtivas. Obrigada pelos ótimos momentos que convivemos nesses dois anos.

Aos amigos do LME Thiago Lopes de Mari, Gabriel Otto Meissner, Valéria Ferrer Pereira, Adriano Morgon, Larissa Vuitika, Aline Viana Bednaski, Bruna Lui, Hanna Camara da Justa, Paula, Alysson, Alana. Agradeço pelo companheirismo, pelas conversas divertidas, conselhos pessoais e pelos dias que passamos convivendo juntos. Agradeço o apoio e a amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR.

A todos os meus familiares por me apoiarem na busca pelos meus objetivos.

À CAPES, Fundação Araucária, FAPESP, SETI, CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

" As coisas mais maravilhosas que podemos experimentar são as misteriosas. Elas são a origem de toda verdadeira arte e ciência. Aquele para quem essa sensação é um estranho, aquele que não mais consegue parar para admirar e extasiar-se em veneração, é como se estivesse morto: seus olhos estão fechados. "

Albert Einstein



## RESUMO

Aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidas como aranhas-marrons, cuja picada é capaz de induzir envenenamento em humanos, em um quadro conhecido como loxoscelismo, o qual se manifesta em sintomas cutâneos e/ou sistêmicos. Tais sintomas incluem dermonecrose com espalhamento gravitacional decorrente de uma resposta inflamatória exacerbada e envolvimento sistêmico que pode incluir insuficiência renal aguda, trombocitopenia e hemólise, podendo ainda levar a vítima a óbito. Entre as diversas toxinas presentes no veneno, destacam-se as fosfolipases-D, as quais são capazes de sozinhas reproduzir manifestações do veneno total, como por exemplo: dermonecrose, aumento na permeabilidade vascular, intensa resposta inflamatória, hemólise, agregação plaquetária e insuficiência renal aguda. As fosfolipases-D apresentam ação nefrotóxica direta sobre o tecido renal, sendo esse efeito dependente da sua atividade enzimática. Nesse ínterim, sabe-se que citocinas e quimiocinas são importantes mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório, podendo estimular ou inibir a resposta imune, sendo este sabidamente influenciado por metabólitos de lipídios ou alterações em membranas celulares. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os mecanismos moleculares e os efeitos biológicos associados ao efeito de fosfolipases-D recombinantes que trouxessem subsídios para a compreensão da atividade nefrotóxica do veneno de aranhas *Loxosceles*. As toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1 foram capazes de induzir aumento de mRNA das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e CXCL1 em células renais humanas (HEK-293) analisadas por PCR quantitativo em tempo real nas concentrações de 50  $\mu$ g/mL e 100  $\mu$ g/mL analisadas nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Ensaio imunoenzimático (ELISA) demonstrou aumento na expressão de proteínas referentes às citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e CXCL1 após 6 horas de incubação. A exposição da linhagem HEK-293 com as toxinas LiRecDT1 e LgRec1 diminuiu a viabilidade celular avaliada pelo método de captação do corante azul de Tripán. Após 6 horas, a LiRecDT1 reduziu o número de células viáveis em 8,4% (superior ao valor apresentado pelo veneno de L.

intermedia de 6,36%). LgRec1 diminui o numero de células viáveis em 6,54% no tempo de 6 horas e 7,42% após 24 horas. Em ensaio *in vivo* com ratos Wistar machos demonstrou-se proteinúria, hemoglobinúria e hematúria, bem como aumento na concentração sérica de ureia e creatinina, marcadores de dano renal. Além disso, estudo *in vivo* com ratos wistar demonstrou que a toxina LiRecDT1 foi capaz de induzir danos renais evidenciados por marcadores de função renal. Dessa forma, nosso estudo caracterizou um perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias frente à exposição de células renais humanas às toxinas dermonecróticas LiRecDT1 e LgRec1. Mais estudos são necessários para melhor entendermos o papel da fosfolipase D no desenvolvimento de insuficiência renal aguda.

Palavras-chave: fosfolipase D, nefrotoxicidade, aranha-marrom, inflamação

## ABSTRACT

Spiders of the genus *Loxosceles*, known as brown-spiders, whose bite can induce poisoning in humans, in a clinical manifestation known as loxoscelism, which manifests as cutaneous and / or systemic symptoms. These symptoms include dermonecrosis with gravitational spreading due to an exacerbated inflammatory response and systemic involvement may include acute renal failure, thrombocytopenia and hemolysis, and may lead the victim to death. Phospholipases-D are able to cause dermonecrosis, hemolysis, platelet aggregation, acute renal failure, increased vascular permeability and dysregulated inflammatory response. Recent data have shown that phospholipase-D has a direct nephrotoxic action on the renal tissue and this effect is dependent on the catalytic site. Meanwhile, it is known that cytokines and chemokines are important mediators involved in the maintenance of the inflammatory process and may stimulate or inhibit the immune response, which is known to be influenced by lipid metabolites or changes in cell membranes. Recombinant toxins LiRecDT1 e LgRec1 induce increased inflammatory cytokine mRNA of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and CXCL1 in human embryonic kidney cells (HEK-293) analysed by real-time quantitative PCR. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed increased protein expression related to cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and CXCL1 after 6 hours of incubation. The incubation of HEK-293 line with the LiRecDT1 LgRec1 toxins demonstrated decreased cell viability assessed by the uptake of trypan blue method. After 6 hours, LiRecDT1 reduced the number of viable cells in 8.4% (higher than the value presented by *L. intermedia* venom 6.36%). LgRec1 decreases the number of viable cells in 6.54% at time of 6 hours and 7.42% after 24 hours. In vivo assay with male Wistar rats showed the presence of protein in the urine (proteinuria), hemoglobinuria and hematuria, and an increase in serum urea and creatinine. Furthermore, in vivo study with Wistar rats exposed to LiRecDT1 demonstrated that dermonecrotic toxin induces renal damage evidenced by markers of renal function. Thus, our study featured a expression profile of proinflammatory cytokines from human kidney cells exposed to the dermonecrotic toxins LiRecDT1 and LgRec1. More studies are needed to better understand the role of phospholipase D in the development of acute renal

failure. In this context, the aim of this study was to evaluate the molecular mechanisms and biological effects associated with the effect of phospholipase-D to bring subsidies for understanding the nephrotoxic activity of the recombinant toxins and LiRecDT1 LgRec1.

Key-words: phospholipase D, nephrotoxicity, brown spider, inflammation

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Aranhas marrons adultas

FIGURA 2- Sistema de filtração glomerular

FIGURA 3- Ensaio de atividade esfingomielinásica das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1

FIGURA 4- Avaliação da qualidade do RNA após extração pelo método de Trizol

FIGURA 5- Expressão relativa de IL-1 $\beta$

FIGURA 6- Expressão relativa de TNF- $\alpha$

FIGURA 7- Expressão relativa de CXCL-1

FIGURA 8- Expressão relativa de IL-6

FIGURA 9- Viabilidade celular

FIGURA 10- Pesquisa de proteinúria

FIGURA 11- Pesquisa de proteinúria

FIGURA 12- Dosagem de creatinina sérica

FIGURA 13- Dosagem de ureia sérica

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação do cDNA dos genes-alvo

TABELA 2- Quadro representativo da expressão dos genes-alvo comparados ao controle PBS analisados por qPCR no tempo de 6, 12 e 24 horas.

TABELA 3- Diferença de expressão do nível de citocinas pelas células HEK-293 de cada grupo analisado após 6 horas de exposição

TABELA 4- Perfil urinário de ratos Wistar machos que receberam PBS (grupo controle), LiRecDT1M H12A 1,0 mg/kg, LirecDT1 1,0 mg/kg e Veneno total 1,0 mg/kg (n=5) 6 horas após injeção.

TABELA 5- Perfil urinário de ratos Wistar machos que receberam PBS (grupo controle), LiRecDT1M H12A 1,0 mg/kg, LirecDT1 1,0 mg/kg e Veneno total 1,0 mg/kg (n=5) 12 horas após injeção.

TABELA 6- Perfil urinário de ratos Wistar machos que receberam PBS (grupo controle), LiRecDT1M H12A 1,0 mg/kg, LirecDT1 1,0 mg/kg e Veneno total 1,0 mg/kg (n=5) 24 horas após injeção.

## LISTA DE SIGLAS

CCL-2: quimiocina (C-C motif) ligante 2 (CCL2)

CCL5: quimiocina (C-C motif) ligante 5 (CCL5)

cDNA: DNA complementar

CXCL1: quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 (CXCL1)

D.O.: densidade óptica

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

TNF-  $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$

IRA: insuficiência renal aguda

LgRec1: fosfolipase D recombinante de *Loxosceles gaucho* isoforma 1

LiRecDT: toxina recombinante dermonecrótica de *Loxosceles intermedia* (*Loxosceles intermedia* Recombinant Dermonecrotic Toxin)

PLD: fosfolipase D

mRNA: RNA mensageiro

PBS: solução salina tamponada com fosfato (“Phosphate Buffer Saline”)

PCR: reação em cadeia da polimerase

rRNA: RNA ribossômico

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

kDa: quilodaltons

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 17        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>   | <b>22</b> |
| 2.1 Objetivo Geral .....  | 22        |
| 2.2 Objetivos Específicos .....   | 22        |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>23</b> |
| 3.1 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....   | 23        |
| 3.2 Loxoscelismo.....   | 24        |
| 3.3 Loxoscelismo cutâneo.....   | 25        |
| 3.4 Loxoscelismo sistêmico.....   | 26        |
| 3.5 Insuficiência renal aguda.....  | 29        |
| 3.6 Néfron.....   | 32        |
| 3.7 Características do veneno loxoscélico.....  | 33        |
| 3.8 Fosfolipase D.....  | 35        |
| 3.9 Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.....  | 38        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>43</b> |
| 4.1 Reagentes.....  | 43        |
| 4.2 Animais .....   | 43        |
| 4.3 Expressão das proteínas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1.....  | 43        |
| 4.3 Cultivo celular.....  | 44        |
| 4.4 Ensaio de atividade esfingomielinásica.....   | 45        |
| 4.5 Metodologia de cultivo celular.....   | 45        |
| 4.6 Viabilidade celular.....  | 46        |
| 4.7 Extração de RNA total.....  | 46        |
| 4.8 Quantificação e integridade do RNA total extraído.....  | 47        |
| 4.9 Desenho de oligonucleotídeos <i>sense</i> e <i>antisense</i> específicos para as<br>citocinas e quimiocinas alvo..... | 47        |
| 4.10 PCR quantitativo em Tempo Real.....  | 48        |
| 4.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas.....  | 49        |
| 4.12 Dosagem de ureia e creatinina séricas .....  | 50        |



|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| 4.13 Perfil urinário.....          | 51        |
| 4.14 Pesquisa de proteinúria ..... | 51        |
| 4.15 Análise estatística .....     | 52        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>         | <b>53</b> |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>          | <b>72</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>          | <b>81</b> |
| <b>REFERENCIAS.....</b>            | <b>82</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Aranhas do gênero *Loxosceles* (família *Sicariidae*), conhecidas como aranhas-marrons, estão entre as espécies de aranhas de grande importância médica devido à gravidade dos acidentes decorrentes do envenenamento provocado pela picada de aranhas-marrons (FUTRELL, 1992; GREMSKI *et al.*, 2014). Possuem uma coloração que varia entre marrom claro a marrom escuro e apresentam uma marca semelhante ao formato de um violino na região dorsal do cefalotórax, sendo também conhecidas como aranhas-violino (HOGAN *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992). As aranhas do gênero *Loxosceles* encontram-se amplamente distribuídas pelo território brasileiro, as quais estão representadas por 12 espécies diferentes já identificadas. Dentre estas, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho*, e *Loxosceles laeta* possuem maior importância médica devido à maior frequência de envenenamentos humanos (GONCALVES-DE-ANDRADE *et al.*, 2012; GREMSKI *et al.*, 2014). Loxoscelismo é o quadro clínico desenvolvido em indivíduos picados por aranhas do gênero *Loxosceles*, caracterizado por duas variantes clínicas: loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico. Manifestações cutâneas incluem dermonecrose com espalhamento gravitacional, inchaço, e eritema perto e no local da picada. O quadro cutâneo-visceral ou sistêmico é caracterizado por falência renal, distúrbios hematológicos como agregação plaquetária que resulta em trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada e hemólise. O envolvimento sistêmico é menos comum do que o cutâneo, mas pode causar severas complicações e levar o indivíduo à morte (CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA, 2008). Além disso, sintomas como fraqueza, febre, náusea, vômito e convulsões, os quais sugerem um efeito em nível de sistema nervoso central já foram reportados (LUCIANO *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992).

O veneno da aranha-marrom é um líquido cristalino e incolor, formado por uma mistura complexa de toxinas enriquecida em proteínas, glicoproteínas e peptídeos de massa molecular heterogênea, com uma predominância de toxinas na região de 2 - 40 kDa (SAMS *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; SWANSON *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; DA SILVEIRA *et al.*, 2002). Enzimas e moléculas biologicamente ativas envolvidas

no efeito tóxico do veneno de *Loxosceles sp.* foram identificadas e caracterizadas bioquimicamente. Venenos de aranha marrom são misturas complexas enriquecido de três famílias moleculares: fosfolipases D, metaloproteases do tipo astacinas (LALP) e peptídeos inseticidas da família ICK (*inhibitor cystine-knot*). Juntos, estas três classes de toxinas compreendem a maioria dos transcritos codificantes do veneno *L. intermedia* (aproximadamente 95%) (GREMSKI *et al.*, 2010). Outras toxinas com baixo nível de expressão também estão presentes no veneno, incluem-se as serino-proteases, inibidores de serino-proteases, hialuronidases, alérgenos e proteína da superfamília da TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*). Entretanto, a toxicidade do veneno de aranha-marrom deve-se a um efeito combinado ou sinérgico de seus componentes (GREMSKI *et al.*, 2010; SADE *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2004; DE CASTRO *et al.*, 2004; DA SILVEIRA *et al.*, 2007).

Dentre as toxinas identificadas no veneno, as fosfolipases D são as mais bem descritas e caracterizadas (DE ANDRADE *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2011). A toxina dermonecrótica é capaz de causar dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária, distúrbio renal, aumento na permeabilidade vascular e resposta inflamatória desregulada (RIBEIRO *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2004), logo reproduz boa parte dos principais efeitos induzidos pelo veneno total. Esta toxina foi previamente caracterizada no veneno de *Loxosceles reclusa* como esfingomielinase D, baseada na geração de ceramida 1-fosfato e colina a partir de esfingomielina (FUTRELL, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2007). Devido à uma gama maior de substratos específicos da enzima, hidrolisando glicerofosfolipídios e esfingolipídios para a geração de ácido lisofosfatídico e ceramida 1-fosfato, sugeriu-se que a toxina seria melhor denominada como fosfolipase-D (LEE *et al.*, 2005, CHAIM *et al.*, 2011). Já foram identificadas no veneno de *L. intermedia* sete isoformas da toxina fosfolipase-D denominadas LiRecDT (*Loxosceles intermedia* Recombinant Dermonecrotic Toxin) (CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008; VUITIKA *et al.*, 2013). As isoformas caracterizadas de toxinas dermonecróticas de *L. intermedia*, apesar de apresentarem sequências aminoácidas muito próximas e conservação dos aminoácidos do sítio catalítico, possuem atividades bioquímicas e biológicas diferenciadas (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007). A análise proteômica do veneno de *Loxosceles*

*gaucho* demonstrou a presença de onze isoformas da enzima fosfolipase-D, denominadas Loxonecroginas ( CUNHA *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2005). O veneno total de *Loxosceles gauch*o, assim como sua fração dermonecrótica, é capaz de causar agregação de plaquetas humanas e de coelhos e induzir danos renais e rabiomiólise (BARBARO *et al.*, 2010; LUCATO *et al.*, 2011). Muitas destas atividades estão associadas com fosfolipases-D, e apesar da elevada homologia existente entre as isoformas, estas apresentam atividades biológicas distintas (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007). BARBARO e colaboradores (1996) demonstraram que o veneno de *L. gauch*o apresenta maior atividade dermonecrótica quando comparado ao veneno de *L. intermedia*. Quando comparadas as atividades esfingomielinásicas dos venenos de *L. intermedia* e *L. gauch*o, demonstrou-se que ambos os venenos apresentam atividade esfingomielinásica e que esta é similar entre os venenos comparados, sendo que o veneno de *L. gauch*o apresenta uma atividade ligeiramente superior ao veneno de *L. intermedia* (BARBARO *et al.*, 2005).

Em virtude do papel da inflamação na fisiopatologia da insuficiência renal aguda, diversos estudos avaliaram o papel das interleucinas. A ativação de células renais epiteliais e endoteliais em fases iniciais de lesão renal demonstraram aumento na expressão de interleucinas, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Acredita-se que a injúria renal induz a expressão de mediadores da inflamação como citocinas e quimiocinas pelas células tubulares e endoteliais renais, contribuindo para o recrutamento de leucócitos aos rins (ORTEGA *et al.*, 2010; NECHEMIA-ARBELY *et al.*, 2008). As citocinas são peptídeos que possuem um papel fundamental na comunicação com o sistema imune e para que as células do sistema imunológico e tecidos do hospedeiro possam trocar informações. Uma cascata de ativações e respostas pode ser vista em virtude da ação das citocinas, e muitas vezes várias citocinas são necessárias agindo em sinergia para expressarem suas funções (BORISH *et al.*, 2003; DINARELLO *et al.*, 2007). TNF-  $\alpha$  e IL-6 são produzidas por células epiteliais tubulares em resposta ao estímulo de IL-1 $\beta$ , além de outros mediadores inflamatórios como fator nuclear kappa B (NF)- $\kappa$ B. Além disso, TNF- $\alpha$  estimula a liberação de quimiocinas da família CXC, como CXCL1 e outras quimiocinas

como IL-8 (SANCHEZ-NINO *et al.*, 2010; DAHA *et al.*, 2000; KRASNA *et al.*, 2009).

Vem sendo demonstrado que a toxina recombinante dermonecrótica fosfolipase-D (LiRecDT1) apresenta ação nefrotóxica dependente do sítio catalítico e deve-se à ligação direta da toxina às estruturas renais, além disso a toxina recombinante foi capaz de reproduzir o efeito nefrotóxico causado pelo veneno total (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008). As toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1 hidrolisam principalmente glicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios gerando ácido lisofosfatídico e ceramida 1-fosfato (LEE *et al.*, 2005; Chaves-Moreira *et al.*, 2011; WILLE *et al.*, 2013). Tais subprodutos são conhecidos por ativar diversas vias de sinalização em vários tipos celulares e induzirem alterações patofisiológicas como resposta inflamatória, agregação plaquetária e aumento da permeabilidade vascular (ANLIKER *et al.*, 2004). Estudos demonstraram um aumento sérico de citocinas e outros mediadores inflamatórios em cultivo celular de fibroblastos humanos expostos ao veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* (TAMBOURGI *et al.*, 1998; DRAGULEV *et al.*, 2007; HORTA *et al.*, 2013). Diversos estudos ressaltam que os mecanismos vinculados à ativação da resposta inflamatória exacerbada são experimentalmente verificados principalmente com toxinas dermonecróticas do veneno loxoscélico. as quais possuem atividade fosfolipásica (VAN MEETEREN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005). A insuficiência renal aguda (IRA) também é uma grave complicação do quadro sistêmico, caracterizada por hematúria e hemoglobinúria, muitas vezes refletindo as desordens hematológicas como hemólise intravascular e coagulação intravascular disseminada (TAMBOURGI *et al.*, 1998; DA SILVA, *et al.*, 2004). Por meio da análise desses estudos questionou-se neste trabalho se a toxina recombinante LiRecDT1 de *L. intermedia* e LgRec1 de *L. gaucho* estariam envolvidas em processos inflamatórios que levam à insuficiência renal aguda decorrente da picada da aranha-marrom. O mecanismo molecular pelo qual o veneno de *Loxosceles* induz nefrotoxicidade ainda não é bem esclarecido. O mecanismo de ação e os eventos que seguem à ação da toxina sobre células renais vêm despertando interesse, pois a insuficiência renal aguda pode causar severas complicações podendo levar até a morte. Assim, esse trabalho apresentou a participação das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1 e os

eventos subsequentes à sua ação na linhagem celular renal embrionária humana HEK-293 e os efeitos biológicos decorrentes da ação da toxina LiRecDT1 em modelos animais, contribuindo com novos dados e informações sobre estas proteínas que compõem o veneno das aranha do gênero *Loxosceles*.

## **2 . OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar os mecanismos moleculares decorrentes da atividade nefrotóxica das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 da aranha-marrom *L. intermedia* e LgRec1 de *L. gaucho*

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar e quantificar a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL1 e TNF- $\alpha$  em linhagem celular HEK-293 expostas às toxinas LiRecDT1, LgRec1 e LiRecDT1M H12A por meio de PCR quantitativo em tempo real.
- Analisar a expressão de proteínas solúveis referentes às citocinas IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL1 e TNF- $\alpha$  em sobrenadante de cultivo celular por meio da técnica de ELISA
- Ensaios de citotoxicidade celular utilizando linhagens celulares estabelecidas em cultura de origem renal, como HEK 293.
- Determinar a ação nefrotóxica em modelo *in vivo* através de parâmetros bioquímicos como ureia e creatinina séricas, pesquisa de proteinúria, hematúria e hemoglobinúria de ratos Wistar machos expostos às toxinas LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e veneno total.

### 3 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

Aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, ordem Araneae, sub-ordem Araneomorfa e família Sicariidae. São conhecidas como aranhas-marrons, em função da coloração que varia de marrom claro a escuro, ou aranhas-violino, devido a uma marca semelhante ao instrumento presente no dorso do cefalotórax do animal. Essas aranhas possuem o corpo dividido em dois segmentos, o cefalotórax (união da cabeça e o tórax) e o abdômen. A partir do cefalotórax projetam-se quatro pares de pernas articuladas, um par de quelíceras (usadas para alimentação e defesa), um par de pedipalpos e três pares de olhos dispostos em semi-círculo. São aranhas de pequeno porte, possuem comprimento corporal variando de 8 a 15 mm e suas pernas medem de 8 a 30 mm. Possuem dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas apresentam o corpo maior e pernas mais curtas em relação aos machos (RUPPERT *et al.*, 2005; PETERSON, 2006).

Aranhas deslocadas do seu ambiente natural acabam por habitar brechas, fendas e orifícios de casas dos humanos. As aranhas *Loxosceles* são animais sedentários, não agressivos e de hábitos noturnos, assim sendo a maioria dos acidentes ocorrem quando as aranhas são comprimidas no corpo no ato de vestir-se, calçar-se, enxugar-se ou durante o sono (FUTRELL, 1992; MALAQUE *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; ISBISTER *et al.*, 2011). São animais bem adaptados às condições domiciliares, favorecendo assim a ocorrência de acidentes com humanos, uma vez que as aranhas-marrons podem se instalar atrás dos quadros, dentro e embaixo da mobília, roupas e sapatos (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005).

As aranhas *Loxosceles* estão entre as espécies de aranhas de grande importância médica devido à gravidade dos acidentes decorrentes do envenenamento provocado pela picada (FUTRELL, 1992). Atualmente há 101 espécies de *Loxosceles* descritas, sendo que 80 são encontradas nas Américas (PLATNICK, 2012). No Brasil, há 11 espécies descritas deste gênero. Dentre essas espécies, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* estão envolvidas em



casos de envenenamento humano (DA SILVA *et al.*, 2004; BERTANI *et al.*, 2010).



FIGURA 1: ARANHAS MARRONS ADULTAS. *Loxosceles gaucho* fêmea (A) e macho (E); *Loxosceles intermedia* fêmea (B) e macho (F); *Loxosceles laeta* fêmea (C) e macho (G). Aranha marrom adulta e ooteca (seta) (D). O desenho característico de um violino na superfície dorsal do cefalotórax da espécie *Loxosceles gaucho* (H). Adaptado de GREMSKI *et al.*, 2014.

### 3.2 Loxoscelismo

A picada da aranha-marrom é descrita como indolor e após cerca de 2 a 8 horas a dor pode variar de leve a severa e é descrita como “queimação” (FUTRELL, 1992; VETTER *et al.*, 2008). A picada das aranhas marrons leva a uma ardência leve, com desenvolvimento de sinais clínicos e sintomas apenas algumas horas depois, consequentemente, a mordida é pouco notada e a aranha é raramente capturada (10% dos casos) no momento da picada. Assim, o diagnóstico do loxoscelismo é geralmente presuntivo e baseado em características clínicas e epidemiológicas apresentadas pelo paciente que chega ao hospital, o que normalmente ocorre entre 12 e 24 horas após a mordida, quando os danos à pele são mais proeminentes (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; HUBBARD *et al.*, 2011; ISBISTER *et al.*, 2011). O envenenamento causado pela picada de aranha do gênero *loxosceles* é conhecido como loxoscelismo. Esse pode se apresentar sob duas variantes clínicas, o loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; TAMBOURGUIL, *et al.*, 2010; CHAIM *et al.*, 2011).

O diagnóstico preciso do loxoscelismo é dificultado, podendo ser sub ou supernotificado, e geralmente é confundido com infecções cutâneas, dermatites, vasculites ou úlcera diabética (VETTER *et al.*, 2008). O número de casos decorrentes do envenenamento com aranhas *Loxosceles sp.* é geralmente subestimada, pois a maioria dos casos não são notificados. A extensão dos efeitos biológicos causados por acidentes loxoscélicos tem múltiplas variáveis, dependendo do agente causador e de diferenças como sexo e idade da aranha, idade da vítima, local da picada, volume de veneno inoculado, entre outras variações (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005).

### **3.3 Loxoscelismo Cutâneo**

Os sintomas clínicos clássicos causados por picadas de aranhas *Loxosceles* são caracterizados por uma intensa reação inflamatória no local da picada, seguido por necrose local e pode ser classificada como loxoscelismo cutâneo (mais de 70% dos casos). Manifestações cutâneas incluem dermonecrose com espalhamento gravitacional, inchaço e eritema perto e no local da picada. Os sinais e sintomas após a picada são dor leve, edema, isquemia do tecido local, hemorragia, além da formação de placa marmórea (halo vermelho, circundando a lesão com uma zona pálida central) (FUTRELL, 1992; CHATZAKI *et al.*, 2012). Em um período de cerca de 5 a 7 dias, a lesão evolui para uma ferida rígida e seca com bordas bem delimitadas, resultando na formação de uma escara de difícil cicatrização ao longo do tempo (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2011; SCHENONE *et al.*, 1989). Como resultado, após 2 a 3 semanas, a formação de úlceras crônicas e destruição do tecido onde ocorreu a inoculação inicial do veneno podem ocorrer, sendo necessário, em muitos casos, reparação cirúrgica (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992). Além do veneno, muitos outros fatores associados às aranhas (variações intra e interespecíficas, o estágio de desenvolvimento e a quantidade de veneno injetado) ou diferenças entre os pacientes (a quantidade de tecido adiposo no local da picada, a concentração de esfingomieline tecidual, a idade do paciente e a variação genética individual) podem influenciar na gravidade da mordida (DA SILVA *et al.*, 2004;.. HOGAN *et al.*, 2004;.. DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; TAMBOURGI *et al.*,

2010). Por exemplo, o tecido adiposo é mais sensível à ação do veneno, levando ao desenvolvimento de necrose e lesão tecidual grave, o que pode exigir cirurgia plástica corretiva. Apesar da gravidade da lesão causada pelo veneno de *Loxosceles* no local da picada, o desenvolvimento de infecções secundárias é raro (HOGAN *et al.*, 2004;. ABDULKADER *et al.*, 2008; ISBISTER *et al.*, 2011; MALAQUE *et al.*, 2011.; HUGUET *et al.*, 2012).

Biópsias de pele de pacientes que sofreram acidente com a picada de aranha-marrom revelaram dados histopatológicos como infiltração inflamatória, acúmulos de leucócitos polimorfonucleares, necrose liquefativa da derme e formação de abscesso (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Análises histopatológicas de pele de coelho em condições experimentais demonstram intensa acumulação de células inflamatórias com massiva diapedese de neutrófilos, deposição de fibrina nos vasos sanguíneos danificados e desorganização nas fibras de colágeno (OSPEDAL *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011).

### **3.4 Loxoscelismo sistêmico**

O loxoscelismo cutâneo-visceral ou sistêmico ocorre com menor frequência (1-27% dos casos), sendo a variante mais grave do acidente com aranhas do gênero *Loxosceles* (SCHENONE *et al.*, 1989; FUTRELL, 1992). O quadro cutâneo-visceral ou sistêmico é caracterizado por falência renal, distúrbios hematológicos como agregação plaquetária que resulta em trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada e hemólise. Em alguns casos o comprometimento sistêmico pode ser a causa de morte, geralmente quando associado a severas complicações hematológicas e renais (DA SILVA, *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2008). Além disso, sintomas como fraqueza, febre, náusea, vômito e convulsões, os quais sugerem um efeito em nível de sistema nervoso central, já foram reportados (FUTRELL, 1992; LUCIANO *et al.*, 2004).

Registros de pacientes que desenvolveram quadro de loxoscelismo sistêmico variam de acordo com a espécie envolvida no acidente. Dados relataram que os casos mais frequentes de pacientes que desenvolveram

lesões sistêmicas ocorreram após acidentes com aranhas da espécie *Loxosceles laeta* (SCHENONE *et al.*, 1989; SEZERINO *et al.*, 1998), menos frequente em acidentes com aranhas das espécies *Loxosceles gaucho* (DE SOUZA *et al.*, 2008) e *Loxosceles reclusa* (WRIGHT *et al.*, 1997; MCDADE *et al.*, 2010).

As alterações celulares e teciduais decorrentes da ação sistêmica do veneno loxoscélico são bem evidenciadas pelos efeitos nefrotóxicos em humanos e animais de laboratório. Em camundongos experimentalmente expostos ao veneno de *L. intermedia*, análises histopatológicas evidenciam comprometimento das estruturas renais, observando-se deposição de material eosinofílico no lúmen dos túbulos proximais e distais, hialinização e presença de eritrócitos no espaço de Bowman, colapso glomerular e alterações da sua membrana basal, sinais de citotoxicidade e edema no epitélio tubular; quadro compatível com a definição de necrose tubular aguda (TAMBOURGI *et al.*, 1998, LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008).

Além disso, os efeitos nefrotóxicos do veneno de *Loxosceles* são demonstrados em dados clínicos e laboratoriais observados em algumas vítimas, que podem incluir elevação dos níveis de creatinina quinase, hematúria, hemoglobínúria e proteinúria (WILLIAMS *et al.*, 1995; LUNG E MALLORY, *et al.*, 2000).

Luciano e colaboradores (2004) observaram, em experimentos utilizando camundongos, os mesmos achados clínicos relatados por pacientes. Seu estudo apontou para uma atividade nefrotóxica do veneno de *Loxosceles intermedia* em estruturas tubulares e glomerulares (LUCIANO *et al.*, 2004). CHAIM e colaboradores (2006) reportaram o efeito nefrotóxico direto como sendo significativamente induzido em especial pela toxina recombinante LiRecDT1 obtida da biblioteca de cDNA de *L. intermedia*. Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando camundongos e linhagem celular epitelial renal canina (MDCK) demonstraram atividade nefrotóxica direta, alterações morfológicas incluindo vacúolos citoplasmáticos, adesão defeituosa ao substrato e adesão célula-célula, além de alteração da viabilidade celular (CHAIM *et al.*, 2006).

Além disso, camundongos expostos a fosfolipase-D recombinante LiRecDT1 apresentaram edema nas estruturas renais como glomérulo, cápsula de Bowman e túbulos renais, eritrócitos na cápsula de Bowman, citotoxicidade demonstrada por desordens em pedicelos e endotélio fenestrado. Urinálises demonstraram hematúria e análise sanguínea demonstrou elevação de ureia sérica. Alterações da função renal como alcalinização da urina, hematúria, azotemia e a associação com as alterações histopatológicas, evidenciam o efeito nefrotóxico causado pelo veneno de aranhas marrons (KUSMA *et al.*, 2008).

A necrose tubular aliada a hematúria e hemoglobinúria decorrente do loxoscelismo sistêmico pode gerar insuficiência renal aguda (IRA). Atribui-se um papel central ao efeito hemolítico para a falência renal, sugerindo que a presença de hemoglobina livre precipitada ao longo do néfron pode retardar o fluxo do fluido tubular e conseqüentemente, reduzindo a taxa de filtração glomerular, resultando na IRA (COUTINHO, 1996).

Recentemente, Malaque *et al.* (2011) constataram que a hemólise leve é frequente em pacientes mordidos por *L. gaucho* (presente em um terço dos casos examinados, incluindo os classificados como loxoscelismo cutâneo). No entanto, a lesão renal aguda ocorreu exclusivamente em pacientes com extensa hemólise, oligúria e urina escura, o que pode sugerir extensa hemólise intravascular ou rabdomiólise, podendo resultar em insuficiência renal aguda, que é a principal causa de morte associada ao loxoscelismo (FRANÇA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; ABDULKADER *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2008; ISBISTER *et al.*, 2011; MALAQUE *et al.*, 2011). Embora grande parte dos casos relatados de loxoscelismo sistêmico ocorram em todas as idades, a maioria dos casos são relatados em crianças (SCHENONE *et al.*, 2001; HOSTETLER *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; HUBBARD *et al.*, 2011; ISBISTER *et al.*, 2011). O mecanismo responsável por causar insuficiência renal aguda induzida por veneno ainda são indefinidos e a lesão renal é atribuída à hemólise, rabdomiólise, choque e ação direta do veneno (CHAIM *et al.*, 2006; LUCATO *et al.*, 2011).

### 3.5 Insuficiência renal aguda (IRA)

A insuficiência renal aguda é classicamente definida como por um quadro clínico de declínio rápido e sustentado na taxa de filtração glomerular (TFG) num curto intervalo de tempo. Conforme a gravidade e duração, pode levar a distúrbios hidroeletrólíticos e ácido base e aumento sérico de uréia nitrogenada (BUN) e creatinina (BRADY *et al.*, 2000; ZAGER *et al.*, 2006; HILTON, 2011). A Taxa de Filtração Glomerular (TFG) é o melhor índice de função renal, e a técnica mais utilizada para a sua avaliação é a medida da depuração plasmática de certos compostos endógenos ou exógenos pelos rins. A taxa de depuração (clearance) é definida como a quantidade de plasma que é depurada de uma substância na unidade de tempo. A determinação estrita da TFG requer a medida da depuração de um marcador que não seja reabsorvido e nem secretado pelo túbulo, sendo excretado na urina apenas por filtração. A TFG poder ser aferida pelo método de infusão endovenosa contínua de substâncias exógenas (exemplo: inulina), com coletas de urina e sangue a intervalos regulares, sendo esta a técnica padrão de depuração renal. A TFG pode ser medida por meio da determinação da concentração plasmática de proteínas endógenas, como ureia, creatinina e cistatina C glomerular (LARSSON, *et al.*, 2004; BOUVET *et al.*, 2006). A dosagem plasmática de ureia foi introduzida como índice de função renal, em 1903, por Strauss. A ureia conserva-se como um teste de baixa precisão por ter poucos caracteres de um marcador ideal, visto que não tem uma produção constante, variando na ingestão e no catabolismo proteico e apresentando uma grande reabsorção tubular. As determinações da creatinina plasmática e da sua depuração em urina de 24 horas são os procedimentos mais utilizados para a avaliação da função de filtração glomerular. Dentre os marcadores de IRA, a depuração da creatinina sérica constitui uma estimativa da função glomerular. É um marcador padrão para a análise da função renal por ser uma proteína endógena, de baixo peso molecular, produzida a uma taxa constante e é livremente filtrada (BAGSHAW *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2008; WAIKAR *et al.*, 2007). A sua concentração sérica depende da taxa de produção e do volume de distribuição corporal (LAMEIRE *et al.*, 2004). Assim, fatores como idade, sexo, massa muscular, metabolismo muscular, peso corporal, ingestão proteica e hidratação

condicionam variabilidade nos valores basais. Da mesma forma condições patológicas extrarrenais como doenças hepáticas, distúrbios musculares, traumatismos e estados febris podem determinar variações. Apesar de menos comum, alguns fatores como a cetoacidose diabética e alguns fármacos podem condicionar uma diminuição na determinação laboratorial pelo método de *Jaffe* da creatinina sérica (BAGSHAW *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2008). A creatinina plasmática é formada a partir da hidrólise não-enzimática da creatina e da fosfocreatina musculares, com um massa molecular de 113 daltons e sem ligação a proteínas plasmáticas. Noventa e oito por cento da creatina é estocada no músculo após ter sido sintetizada no fígado a partir dos aminoácidos glicina e arginina. A outra fonte de creatina é a ingestão de proteína animal (MYERS *et al.*, 2006; BOUVET *et al.*, 2006).

Os critérios diagnósticos de IRA baseiam-se tanto nas elevações dos níveis séricos da creatinina quanto na diurese. Embora o rim tenha numerosas funções, estas são as únicas funções que são rotineiramente e facilmente mensuráveis e que são exclusivos ao rim. A precisão na depuração da creatinina é limitada, porque assim como a taxa de filtração glomerular (TFG) diminui, a secreção de creatinina é aumentada, e, portanto, o aumento da creatinina sérica é menor (BELLOMO *et al.*, 2004; DOOLAN *et al.*, 1962; KIM *et al.*, 1969). Assim, a excreção de creatinina é muito maior do que a carga filtrada, resultando em uma superestimação da TFG (BELLOMO *et al.*, 2004). Como a depuração da creatinina, a creatinina sérica não vai ser um reflexo preciso da TFG na condição de estado não-estacionário de IRA. No entanto, o grau em que as alterações de creatinina sérica ocorrem a partir da concentração basal vai refletir a mudança na TFG. A produção de urina é muito menos específica, exceto quando ela é severamente reduzida ou ausente. Severa IRA pode existir apesar da produção de urina normal, mas as mudanças na produção de urina podem ocorrer muito antes que as alterações bioquímicas tornem-se aparentes.

A ureia é uma molécula endógena, hidrossolúvel e de baixa massa molecular que deriva do metabolismo protéico e constitui um marcador urêmico. Sua concentração sérica é modulada por fatores renais e extrarrenais, independentes da lesão/disfunção renal, sendo assim considerado apenas

como um marcador auxiliar no diagnóstico da IRA. A taxa de produção de ureia não é constante e um aumento da ureia sérica pode resultar de condições extrarrenais como alimentação ou catabolismo proteico aumentado, hemorragia gastro-intestinal, trauma e terapia com glicocorticoides, sem que a função renal esteja diminuída (BAGSHAW *et al.*, 2008; URBSCHAT *et al.*, 2011).

A análise urinária constitui um método não-invasivo, disponível e de baixo custo. A pesquisa de marcadores urinários específicos e sensíveis para a IRA inclui presença de proteínas ou enzimas expressas de forma constitutiva nas células tubulares renais, que são excretadas na lesão tubular aguda ou podem ser marcadores induzíveis, isto é, produtos de genes cuja transcrição/tradução é ativada na lesão tubular. O valor de proteínas de baixa massa molecular na urina tem sido amplamente estudado, e a sua fácil e rápida determinação podem ser determinantes para a aplicação na prática clínica (KOYNER *et al.*, 2010). Estas moléculas livremente filtradas no glomérulo, pelo sua massa molecular, são reabsorvidas no túbulo proximal. Em condições fisiológicas, a sua concentração urinária é indetectável e a sua identificação urinária parece estar associada a lesão/disfunção tubular proximal ou sobrecarga tubular. A utilidade destas proteínas como biomarcadores na definição de IRA pode ser limitada por proteinúria glomerular significativa ou hiper-filtração glomerular (LISOWSKA-MYJAK *et al.*, 2010).

A isquemia, causa mais comum de IRA, representa 72% dos casos. A fisiopatologia da isquemia/reperfusão é multifatorial, envolvendo uma somatória de eventos hemodinâmicos, tubulares, celulares que levam à súbita queda na taxa de filtração glomerular (GUELER *et al.*, 2002; JAIN *et al.*, 2000). Ocorre um processo de vasoconstrição intrarrenal, dano intracelular com depleção de ATP, acúmulo de cálcio intracelular, geração de espécies reativas de oxigênio, ativação de fosfolipase e alterações da membrana plasmática (THADANI *et al.*, 1996; TSAGALIS *et al.*, 2011). A IRA pode ainda ser resultado de uma ação nefrotóxica. As nefrotoxinas endógenas ou exógenas provocam IRA por diferentes mecanismos, entre eles, vasoconstrição intraglomerular, lesão direta do epitélio tubular e obstrução intratubular (BRADY, 1995).



### 3.6 Néfron

O néfron, unidade funcional do rim, é formado pelo glomérulo e cápsula de Bowman, túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor. O glomérulo é responsável pela produção de um ultrafiltrado a partir do plasma, formado por uma rede de capilares especializados. A parede do capilar glomerular é formada por células endoteliais ou lâmina fenestrada, membrana basal constituída principalmente pelas moléculas colágeno IV, laminina, entactina e heparam sulfato proteoglicano e células epiteliais (podócitos) (OBEIDAT *et al.*, 2012). Apesar de ter uma resistência à passagem de água extremamente baixa, a barreira de filtração glomerular restringe eficientemente a passagem de proteínas do sangue para o espaço de Bowman, com base no seu tamanho, carga elétrica e conformação molecular. Moléculas grandes e carregadas negativamente são menos filtradas que as pequenas e sem carga ou carregadas positivamente. Apesar disso, em condições fisiológicas, proteínas de baixa massa molecular e uma pequena quantidade de albumina atravessam a barreira de filtração glomerular, mas são, em grande parte, reabsorvidas pelas células tubulares. Aumento na excreção de proteínas na urina pode ser decorrente de aumento de sua filtração, por alterações na permeabilidade seletiva glomerular, ou de defeitos em sua captação tubular. A filtração é dirigida por forças de Starling que atuam sobre a parede do capilar glomerular, e depende da sua área de superfície e alta permeabilidade à água. Células endoteliais glomerulares são extremamente planas e perfuradas por poros transcelulares, endotélio fenestrado. Um elaborado glicocálice, que cobre as células endoteliais glomerulares e suas fenestrações forma uma barreira que, em conjunto com outros componentes da parede capilar glomerular, impede a perda de proteínas do plasma para a urina (OBEIDAT *et al.*, 2012; BOHLE *et al.*, 1998; HARALDSSON *et al.*, 2009). Sabe-se que o veneno de *L. intermedia* tem atividade entactinolítica, e também degrada o domínio protéico do proteoglicano de heparam sulfato, considerado um importante constituinte molecular encontrado nas membranas basais, estruturas fundamentais nos glomérulos renais, envolvidos na formação da urina (VEIGA *et al.*, 1999; LUCIANO *et al.*, 2004).

Estudos recentes com veneno de *L. gaucha* em camundongos (LUCATO *et al.*, 2011), mostram que o veneno pode causar lesão renal e rabdomiólise, sendo que os possíveis fatores que contribuem para a lesão renal foram a vasoconstrição renal e mioglobínúria. Além disso, neste trabalho não foram observados coagulação intravascular disseminada, isquemia e toxicidade em células endoteliais.

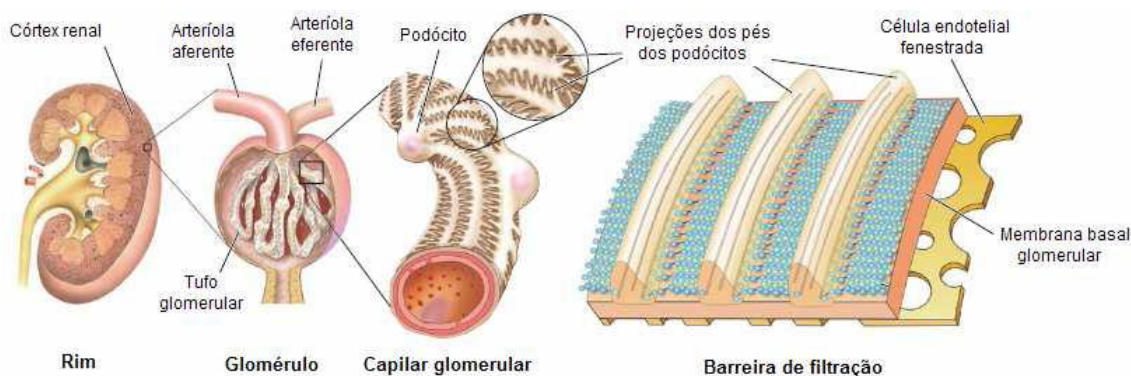


FIGURA 2: SISTEMA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR. Cada rim humano contém cerca de 1.000.000 de glomérulos. As arteríolas aferentes dão origem aos capilares glomerulares, cujas paredes constituem a barreira de filtração glomerular. A barreira de filtração glomerular é composta por células endoteliais fenestradas, membrana basal glomerular e podócitos, com as projeções de suas projeções citoplasmáticas formando interdigitações. **Adaptado de TRYGGVASON e WARTIOVAARA, 2005.**

### 3.7 Características do veneno loxoscélico

O veneno total de *Loxosceles* é uma mistura complexa de diferentes enzimas, moléculas biologicamente ativas e toxinas produzidas por glândulas que se encontram no cefalotórax da aranha. É composto por proteínas de alta massa molecular, menos expressas, e uma maior quantidade de proteínas de baixa massa molecular, compondo um perfil eletroforético com bandas entre 2 e 40 kDa. O perfil eletroforético em gel bidimensional demonstrou que o veneno de *L. intermedia* possui uma prevalência de componentes de baixa massa molecular (RIBEIRO *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2002 (VEIGA *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2004; DE CASTRO *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005). Alguns constituintes do veneno de *Loxosceles intermedia* já foram identificados, como toxinas dermonecróticas (fosfolipases-D), hialuronidases (SILVEIRA *et al.*, 2007; FERRER *et al.*, 2013), metaloproteases do tipo

astacinas (LALP), serino-proteases (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008, GREMSKI *et al.*, 2010), proteína da superfamília da TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) (GREMSKI *et al.*, 2010; SADE *et al.*, 2012) e peptídeos inseticidas da família ICK (*inhibitor cystine- knot*) (GREMSKI *et al.*, 2010). O perfil eletroforético é muito similar quando se compara o veneno total das espécies *L. intermedia* e *L. gaucho*, com presença de bandas na faixa entre 33 e 35 kDa de massa molecular (BARBARO *et al.*, 1994). O alto percentual de similaridade nas sequências N-terminal destas toxinas presentes nas duas espécies brasileiras sugere fortemente que estas enzimas seriam isoformas de uma mesma proteína (BARBARO *et al.*, 1996).

A toxicidade do veneno de aranha-marrom deve-se a um efeito combinado ou sinérgico de seus componentes (GEREN *et al.*, 1976; GEREN *et al.*, 1973). Metaloproteases de 20-28 kDa com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica (Loxolisina A) e de 32-35 kDa com atividade gelatinolítica (Loxolisina B) identificadas no veneno estão possivelmente relacionadas a distúrbios hemostáticos decorrentes da atividade da Loxolisina A e distúrbios como hemorragia da derme, injúria de vasos sanguíneos, interferência na adesão plaquetária e dificuldade na cicatrização das lesões cutâneas decorrentes da atividade da Loxolisina B (VEIGA *et al.*, 2001; KUSMA, 2008). Hialuronidases com mobilidade eletroforética em 41 kDa e 43 kDa estão possivelmente envolvidas na extensão das lesões dermonecroticas, pois potencializariam a ação de outros componentes do veneno, facilitando a penetração destes em vários tecidos e na circulação sanguínea. A hialuronidase possui atividade de hidrolase, sendo capaz de degradar ácido hialurônico e condroitin sulfato, componentes da matriz extracelular. A idéia de que hialuronidases apresentam papel no espalhamento gravitacional na dermonecrose e/ou na difusão sistêmica das toxinas do veneno deve-se à sua ação sobre ácido hialurônico e outros glicosaminoglicanos que mantêm a integridade e estabilidade de tecidos (DA SILVA *et al.*, 2004; FERRER *et al.*, 2013). Os mecanismos pelos quais ocorre lesão celular e tecidual não são totalmente esclarecidos, assim como o papel dos mediadores inflamatórios envolvidos no acidente após a picada da aranha-marrom. Os eventos inflamatórios provocados pela ação do veneno podem estar relacionados com

a degranulação de mastócitos e com a liberação de histamina, causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e infiltração de neutrófilos (RATTMANN, *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009).

### 3.8 Fosfolipase D

A família de toxinas fosfolipase D (PLD) é a mais estudada e caracterizada presente no veneno de aranhas da espécie *Loxosceles* (DA SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2009). Por meio de clonagem e expressão recombinante de toxinas dermonecróticas por técnicas de biologia molecular e análise de proteoma, confirmou-se a existência de um grupo de proteínas homólogas que compõem uma grande família de toxinas dermonecróticas (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Sete isoformas da toxina fosfolipase D foram identificadas no veneno de *Loxosceles intermedia*. Chaim *et al.* (2006), a partir de uma biblioteca de cDNA de glândulas de veneno de aranhas *L. intermedia*, clonou e expressou uma toxina dermonecrótica funcional denominada LiRecDT (*Loxosceles intermedia* Recombinant Dermonecrotic Toxin). Em seguida foram clonadas e expressas LiRecDT2 e LiRecDT3 com reatividade imunológica cruzada e atividade dermonecrótica, resposta inflamatória, agregação plaquetária e aumento da permeabilidade vascular (DA SILVEIRA *et al.*, 2006). Recentemente, DA SILVEIRA *et al.* (2007) demonstrou a existência de outras duas toxinas dermonecróticas, LiRecDT4 e LiRecDT5. APPEL *et al.* (2008) demonstrou a existência de outra isoforma, LiRecDT6, a qual provoca resposta inflamatória na derme, aumento da permeabilidade vascular, edema, letalidade em camundongos e agregação plaquetária. VUITIKA e colaboradores (2013) descreveram a clonagem, expressão heteróloga, purificação e avaliação funcional de uma nova isoforma da toxina fosfolipase D no veneno de *L. intermedia*, a isoforma 7. As isoformas caracterizadas de toxinas dermonecróticas de *L. intermedia*, apesar de apresentarem sequências aminoacídicas muito próximas e conservação dos aminoácidos do sítio catalítico, possuem atividades bioquímicas e biológicas diferenciadas (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Esta toxina foi previamente caracterizada no veneno de *Loxosceles reclusa* como esfingomielinase D, baseada na geração de ceramida 1-fosfato e colina a partir de esfingomielina (FUTRELL, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2007). Devido à uma gama maior de substratos específicos da enzima, hidrolisando glicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios para a geração de ácido lisofosfatídico e ceramida 1-fosfato, sugeriu-se que a toxina seria melhor denominada como fosfolipase D (LEE *et al.*, 2005, CHAIM *et al.*, 2011). Apresentam mobilidade eletroforética em gel bidimensional de 30 a 35 kDa. Foram caracterizadas várias isoformas desta toxina nos venenos loxoscélicos, e demonstrou-se que há um alto nível de identidade entre elas, assim sendo denominadas de família Loxtox (*Loxosceles toxin*) por alguns autores (KALAPOTHAKIS, 2007). São ainda denominadas como fator/proteína dermonecrótica, devido sua principal atividade biológica de induzir a dermonecrose (APPEL *et al.*, 2005).

Murakami e colaboradores (2006) reportaram estudos da estrutura por cristalografia e difração de raios-X de uma isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de *L. laeta*. Esta enzima possui a forma de um barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, formada por folhas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélices conectadas por 3 *loops* denominados de *loop* flexível, *loop* hidrofóbico e *loop* catalítico. O *loop* catalítico (resíduos 46-60) contém os resíduos de His12 e His47, que são conservados entre as esfingomielinases-D de aranhas e bactérias, e que juntamente com o íon Mg<sup>+2</sup> formam o sítio catalítico capaz de hidrolisar esfingomielina. Neste mesmo estudo, os autores sugerem um mecanismo catalítico para o processo da hidrólise, comportando-se como um nucleófilo que ataca a ligação fosfodiéster do substrato, gerando uma estrutura penta-coordenada. Já a His12 doa um próton (H<sup>+</sup>) para esta estrutura penta-coordenada gerando a colina. A His12 retira um átomo de H<sup>+</sup> da molécula de água, iniciando um segundo ataque nucleófilo sobre o intermediário da reação, que dessa vez, resulta na formação e liberação da ceramida-1- fosfato (C1P).

Giuseppe e colaboradores (2011) descreveram a estrutura tridimensional de uma fosfolipase-D recombinante pertencente à classe II (subclasse IIa) de *Loxosceles intermedia*, denominada LiRecDT1. Esta toxina também possui forma de TIM barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> e possui os *loops* catalítico, flexível e variável. Fazendo uma análise comparativa entre a isoforma PLD1 de *L. laeta* (Classe I)

e a LiRecDT1 de *L. intermedia* (Classe II), os autores mostram que além da ponte dissulfeto nos aminoácidos Cys51 e Cys57, a LiRecDT1 possui uma ponte dissulfeto adicional nos aminoácidos Cys53 e Cys201, ligando o *loop* flexível ao *loop* catalítico. Esta ponte adicional favorece o deslocamento do *loop* flexível em direção ao *loop* catalítico, diminuindo a cavidade do sítio catalítico.

Chaim e colaboradores (2011) demonstraram que a atividade fosfolipásica da isoforma recombinante de fosfolipase-D de *L. intermedia* (LiRecDT) possui especificidade por diferentes substratos. A toxina é capaz de hidrolisar uma variedade de fosfolipídeos como esfingolipídeos e fosfoglicerídeos, em especial esfingomielina e lisofosfatidilcolina. WILLE e colaboradores (2013) em experimentos de cinética de degradação de fosfolipídios determinaram que a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 hidrolisa principalmente esfingomielina em um processo tempo-dependente, gerando ceramida 1-fosfato e colina; assim como lisofosfatidilcolina, gerando ácido lisofosfatídico (LPA) e colina em células tumorais B16-F10, mas demonstra hidrolisar com menor intensidade quando o substrato é o fosfolipídeo fosfatidilcolina.

Dados clínicos e laboratoriais observados em pessoas vítimas de acidentes com aranhas-marrons demonstram o efeito hemolítico induzido pelo veneno de aranhas *Loxosceles*. Esses achados incluem níveis elevados de creatinina quinase, hematúria, hemoglobinúria e proteinúria (WILLIAMS et al., 1995; LUNG E MALLORY, 2000). A toxina recombinante fosfolipase D apresenta efeito hemolítico direto em eritrócitos humanos, dependente da atividade catalítica da enzima. A LiRecDT1 é capaz de induzir hemólise, causando poiquilocitose, anisocitose em um processo concentração e tempo dependentes. Porém, o efeito hemolítico é diferenciado entre espécies animais, sendo que ovinos, humanos e roedores mostram porcentagens de hemólise diferentes. Sabe-se que a ligação da LiRecDT1 na membrana de eritrócitos causa reorganização lipídica da membrana, com externalização de fosfatidilserina (CHAVES-MOREIRA et al., 2009; CHAIM et al., 2011).

Análise proteômica do veneno de *L. gaucha* levou à identificação de pelo menos onze isoformas de fosfolipases D, denominadas loxnecroginas (CUNHA et al., 2003; MACHADO et al., 2005). O veneno de *L. gaucha* possui muitas atividades importantes, tais como a capacidade para ativar os queratinócitos

em cultura primária para a produção de TNF- $\alpha$  (MALAQUE *et al.*, 2009), induzir distúrbios hematológicos e hemostáticos em coelhos (TAVARES *et al.*, 2004), causar reação inflamatória intensa, hidrolisar esfingomielina, e estimular a geração de citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos (BARBARO *et al.*, 2010). Além disso, o veneno de *L. gaucha*, assim como a sua fração dermonecrótica promove agregação plaquetária humana e de coelho e induz danos aos rins e rabdomiólise. Muitas dessas atividades estão associadas a PLD, e apesar da elevada homologia partilhada por estas toxinas, estas podem exibir atividades biológicas distintas. A clonagem de uma isoforma de PLD da glândula de veneno de *L. gaucha*, chamada LgRec1, expressa em sistema bacteriano, demonstrou que essa isoforma é capaz de causar reação local, tais como edema, eritema, equimose e palidez, dermonecrose e hemólise. Foi também capaz de hidrolisar esfingomielina e promover a agregação de plaquetas (LUCATO *et al.*, 2001; TAVARES *et al.*, 2011).

### **3.9 Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias**

Citocinas são um grupo diversificado de proteínas não humorais que agem como mediadoras entre células. Elas foram inicialmente identificadas como produtos das células imunes que agem como mediadoras e reguladores dos processos imunes, mas agora se sabe que muitas citocinas são produzidas por células que não são do sistema imune e que têm efeito no sistema não-imune. Citocinas não são tipicamente armazenadas como proteínas pré-formadas. Ao invés disso a sua síntese é iniciada por transcrição gênica e seus mRNA têm vida curta. Eles são produzidos à medida que são necessários (ORTEGA *et al.*, 2010). As citocinas são sintetizadas no Golgi e podem trafegar através do retículo endoplasmático para serem liberadas como mediadores solúveis, ou podem permanecer ligadas à membrana, ou podem ainda retornar ao núcleo, onde podem agir como reguladores da transcrição. A regulação celular da transcrição de citocinas depende do recrutamento de fatores de transcrição para a região promotora dos genes alvo. A ligação do fator de transcrição permite a ativação de inúmeras vias de sinalização que regulam a expressão de citocinas em resposta a um estímulo (MCINNIS, 2010).

Uma citocina frequentemente influencia a síntese de outras citocinas. Elas podem produzir cascatas, ou aumentam ou suprimem a produção de outras citocinas. Além disso, elas podem frequentemente influenciar a ação de outras citocinas (ORTEGA *et al.*, 2010). Quimiocinas são moléculas com função quimiotática e são agrupadas na grande família das citocinas. São produzidas por leucócitos e por vários tipos de células teciduais e são consideradas moléculas chaves na regulação e migração de leucócitos para os tecidos lesados, desempenhando funções importantes nas diferentes vias dos processos inflamatórios (BAGGIOLINI *et al.*, 2005; GERARD, 2001). As quimiocinas, quimiotáticas e imuno-modulatórias para células como os leucócitos, também são amplificadas pela ação das citocinas, como IL-1 e TNF- $\alpha$  (LUSTER, 1998). As citocinas, um grupo de proteínas com funções celulares pleiomórficas na inflamação, crescimento e diferenciação celular, são classificadas como pró-inflamatórias (como IL-1, TNF- $\alpha$ ) ou anti-inflamatórias (como IL-10) e seus níveis sistêmicos podem estar elevados em casos de insuficiência renal aguda devido a um aumento de sua expressão pelas células renais. Além de modular a resposta inflamatória, há evidências de sua ação no estímulo para apoptose celular na IRA através da interação do TNF- $\alpha$  e seu receptor tipo 1 (CUNNINGHAM *et al.*, 2002).

Uma das primeiras citocinas envolvidas com o início da inflamação é a interleucina 1 (IL-1). Esta citocina promove o recrutamento e transmigração de leucócitos e estabelece um microambiente adequado ao desenvolvimento da inflamação. A isoforma IL-1 $\beta$ , assim como fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) causam aumento na expressão de moléculas de adesão celular, contribuindo para a adesão e transmigração dos leucócitos no endotélio (SMITH, 2007). TNF- $\alpha$  atua promovendo a inflamação, apoptose e acúmulo de matriz extracelular, reduzindo o fluxo sanguíneo glomerular e danificando a barreira de filtração glomerular, levando ao desenvolvimento de albuminúria (SANCHEZ-NINO *et al.*, 2010). A interleucina-8 (IL-8) pertence ao grupo das quimiocinas C-X-C e é produzida por diferentes tipos de células. Sua principal função biológica é induzir a migração de células efetoras, principalmente os neutrófilos para os tecidos adjacentes (NIEMIR *et al.*, 2004; SWENSSON *et al.*, 1991). A indução da expressão da interleucina-6 foi observada em casos de



insuficiência renal aguda em humanos e em modelos animais (SIMMONS *et al.*, 2004; VAIDYA *et al.*, 2003; NECHEMIA-ALBERLY *et al.*, 2008). A IL-6 é caracterizada por seus efeitos pleiotrópicos e regula vários aspectos da resposta imune, reações de fase aguda e hematopoiese. Contribui para o aumento da expressão de moléculas de adesão, auxiliando na migração de leucócitos para a região lesionada. Apresenta uma forte relação com o TNF- $\alpha$  (NECHEMIA-ALBERLY *et al.*, 2008).

As quimiocinas, entre elas as da família CC (CCL-2/MCP-1) e CXC (CXCL1) têm sido reconhecidas como importantes mediadores na infecção. As quimiocinas CXC são produzidas por células epiteliais dos túbulos renais em humanos e são relatadas como indutoras do deslocamento de neutrófilos polimorfonucleares, promovendo inflamação intersticial nas infecções renais (GRAHAM *et al.*, 2009; HUNG *et al.*, 2006).

Processos inflamatórios mediados por citocinas têm sido implicados na patogênese da insuficiência renal aguda, em que ocorre uma lesão de células e dos tecidos associadas com a liberação de alguns mediadores que podem iniciar um processo de inflamação (AKCAY *et al.*, 2009; ORTEGA *et al.*, 2010).

Toxinas com atividade enzimática, especialmente proteases e fosfolipase A2, são conhecidas por iniciarem processos inflamatórios que envolvem a geração de citocinas pró-inflamatórias e mediadores vasoativos, resultando em alterações hemodinâmicas sistêmicas e renal. Uma série de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios são liberados após exposição a toxinas com atividade enzimática (CHISARI *et al.*, 2008; SITPRIJA, 2008). As manifestações renais decorrentes de envenenamento por toxinas animais, que são geralmente agudas, resultam principalmente destes efeitos enzimáticos. Todas as estruturas renais podem ser afetadas e um processo de necrose tubular é comum (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006). Processo inflamatório mediado por citocinas inflamatórias tem sido implicado na patogênese da lesão renal aguda e doença renal crônica, em que células endoteliais e tecidos danificados estão associados com a liberação de alguns mediadores que podem iniciar a cascata inflamatória. Diferentes padrões de expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias caracterizam o

quadro de insuficiência renal aguda (IRA), glomerulonefrite e estágios finais da doença renal. A ativação de células epiteliais e endoteliais resultam na supra-regulação de uma variedade de quimiocinas e citocinas, incluindo, mas não se limitando a, IL-1, IL-6, IL-8, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (MUNSHI *et al.*, 2011) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (SANCHEZ-NINO *et al.*, 2010; ORTEGA *et al.*, 2010). O papel que estas respostas celulares precoces desempenham no agravamento da função renal ainda não foi determinado. Elevados níveis plasmáticos de IL-6, IL-8 e IL-10 em pacientes com lesão renal aguda estão relacionados com maiores índices de mortalidade durante internação hospitalar (SIMMONS *et al.*, 2004). Em modelo de falência renal aguda nefrotóxica por maleato observou-se aumento na expressão da quimiocina CCL-2 sérica (MCP-1), indicando que a quimiocina CCL-2 é um marcador de IRA (MUNSHI *et al.*, 2011; ORTEGA *et al.*, 2010; AKCAY *et al.*, 2009; ). KRASNA e colaboradores (2009) demonstraram que há um aumento na expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 tanto por células endoteliais e epiteliais após lesão por isquemia-reperfusão.

Em DE SOUZA e colaboradores (2008) foi reportado um acidente com aranha do gênero *Loxosceles* ocorrido com homem de 26 anos em que foi possível observar por meio de técnica de ELISA aumento na expressão de proteínas sanguíneas referentes às citocinas pro-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  no dia em que ocorreu o acidente (dia 1). Em cultivo celular de fibroblastos humanos incubados com fosfolipase D isoforma 1 de *L. reclusa* foi demonstrado um perfil de genes suprarregulados associados à patofisiologia da PLD, dentre eles estão as citocinas humanas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL2 e CCL5. O aumento de expressão de mRNA levou a um aumento na expressão de proteínas referentes às citocinas mencionadas, atingindo um pico na expressão após 5 horas de incubação com a PLD de *L. reclusa* (DRAGULEV *et al.*, 2006). Em sobrenadante de cultivo celular de queratinócitos expostos ao veneno total de *L. gaucho* foi possível detectar expressão de TNF- $\alpha$  após 6 e 12 horas de incubação pelo método de ELISA (MÁLAQUE *et al.*, 1999). Em um modelo animal de lesão renal por isquemia/reperfusão foi demonstrado aumento significativo na expressão de mRNA de IL-6 após 4 horas de reperfusão (KIELAR *et al.*, 2005; SANG-KYUNG *et al.*, 2006) e aumento na

expressão de mRNA de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  após 24 horas de reperfusão por meio da técnica de PCR quantitativo tempo real (SANG-KYUNG *et al.*, 2006).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Reagentes**

Os sais utilizados foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O meio de cultura *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM) e soro fetal bovino foram adquiridos da Cultilab (Campinas, Brasil). Anestésico Ketamine – Agribands (Paulínia, Brasil) e Xilazina. A Albumina de Soro Bovino (BSA) foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR tempo real foram produzidos sob encomenda pela IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa). Os reagentes para as reações de PCR tempo real foram adquiridos da Life Technologies Corporation (USA). A outros reagentes que se fizeram necessário, foram obtidos de fornecedores confiáveis como Gibco, Amersham, Merck, Bio-Rad Laboratories, entre outros.

### **4.2 Animais**

Foram utilizados neste estudo ratos Wistar machos adultos, pesando aproximadamente 180-200 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR em ciclos de 12 horas claro-escuro, com livre acesso à água e ração. Os experimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) (certificado 741). Este projeto faz parte de um grande projeto de pesquisa: Biodiversidade, toxinas e aplicações biotecnológicas, sob coordenação do professor Silvio Sanches Veiga (Certificado nº247).

### **4.3 Expressão das proteínas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1**

As toxinas utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de uma biblioteca de cDNA das glândulas produtoras de veneno das aranhas *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles gaucho*, como descrito em CHAIM e colaboradores (2006) e MAGALHÃES e colaboradores (2013). As proteínas recombinantes foram expressas a partir de construções de proteínas de fusão com cauda “6x His-Tag” na região N-terminal. Cepas de *E. coli* BL21 (DE3)

pLysS (Invitrogen) foram transformadas por método químico com as construções LiRecDT1 e LgRec1 todas em vetor de expressão pET-14b. As bactérias quimiocompetentes foram ressuspensas em 1 mL de meio SOC (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; KCL 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM; glicose 0,2 M) a 37°C por 1 hora sob agitação de 200 rpm. Os clones transformados foram selecionados em meio LB-ágar (luria-bertani-ágar) contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Uma única colônia de cada construção foi inoculada em 15 mL em meio LB líquido (ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas. Estas culturas foram inoculadas na diluição de 1:100 em meio de cultura contendo 1000 mL de LB líquido já acrescido com os respectivos antibióticos. As culturas foram monitoradas pelo método de determinação da densidade óptica (D.O.). Quando alcançou-se a D.O. (550 nm) entre 0,4 e 0,5 as bactérias foram induzidas a expressar proteínas adicionando-se IPTG na concentração final de 0,05 mM para LiRecDT1 e 1mM para LgRec1 (MAGALHÃES *et al.*, 2013). Após 3,5 horas as culturas foram centrifugadas a 9000 xg por 7 minutos a 4°C e tiveram seus sobrenadantes descartados. Cada sedimento foi ressuspensado em 10 mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM ph 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM e lisozima 1 mg/mL). As suspensões bacterianas foram lisadas pelo método da Prensa de French, a qual lisa as bactérias sob pressão mecânica. As proteínas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1 foram purificadas por cromatografia de afinidade em resina Ni+2-NTA agarose e analisadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) 12,5% em condições redutoras (5% de β-mercaptoetanol).

### 4.3 Cultivo Celular

A linhagem celular renal embrionária humana HEK-293 (ATCC® CRL 1573) foi obtida da American Type Tissue Culture Collection (Manassas, USA). As células foram mantidas em *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM, Cultilab) contendo penicilina/estreptomicina (1000U/mL), suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab). As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C, em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **4.4 Ensaio de atividade esfingomielinásica**

A atividade esfingomielinásica da fosfolipase D LiRecDT1, LiRecDT1 H12A, LgRec1 foi determinada utilizando-se o Amplex<sup>®</sup> Red Phospholipase D Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, USA). Neste ensaio, a atividade de fosfolipase - D é monitorada usando 10 - acetil - 3 ,7 – dihidroxiphenoxazine ( reagente Amplex Red) , uma sonda fluorogênica sensível para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em primeiro lugar, a fosfolipase hidrolisa esfingomielina à ceramida - 1- fosfato e colina. A colina é oxidada pela enzima colina oxidase a betaína e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de peroxidase, reage com o Amplex Red numa estequiometria de 1:1, gerando um produto altamente fluorescente , o Resorufin (CHAVES-MOREIRA et al., 2011). Para mensurar a atividade fosfolipásica das toxinas LiRecDT1, LiRecDT1 H12A, LgRec1, estas foram incubadas com o Reagente Amplex Red, em triplicata, à 37°C por 30 minutos. Foi utilizado como controle positivo o veneno total (10µg), e controle negativo apenas o Reagente Amplex Red sem a toxina, ambos também em triplicata à 37°C por 60 minutos. A fluorescência foi mensurada em espectrofluorímetro (Tecan Infinite M200, Männedorf, Switzerland) usando comprimento de onda de excitação em 540 nm e emissão em 570 nm.

#### **4.5 Metodologia de cultivo celular**

As células HEK-293 foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, em meio DEMEM suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab). As células foram então coletadas dos frascos de cultura utilizando-se tripsina-EDTA (Life Technologies Corporation, USA) até a completa dispersão da camada de células. A suspensão de células foi centrifugada a 180 x g por 3 minutos e ressuspensa em meio de cultura apropriado. Fez-se contagem das células em câmara de Neubauer e foram plaqueadas na densidade de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL em placas de 6 poços e mantidas em estufa úmida a 37°C, em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub>, por 24 horas.

No dia seguinte, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS e incubadas com a proteína recombinante LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e LgRec1, todas nas concentrações de 50 µg/mL e 100µg/mL. O grupo controle foi incubado com tampão PBS. Após o tratamento, as placas foram mantidas em

estufa úmida a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de 6 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas de incubação, o meio de cultura de cada poço foi retirado e as células foram mantidas em microtubo para a extração de RNA total pelo método de Trizol<sup>®</sup>.

#### **4.6 Viabilidade celular**

Placas de 24 poços contendo 10<sup>5</sup> células/mL de HEK-293 tiveram o meio aspirado e foi adicionado às células 300 µL de veneno total de *L. intermedia* a 50 µg/µL, LiRecDT1 H12A 100 µg/µL, LiRecDT1 50 µg/µL, LiRecDT1 100 µg/µL, LgRec1 50 µg/µL e LgRec1 100 µg/µL e controle PBS. Após 6, 12 e 24 horas avaliou-se a viabilidade celular pelo método de Azul de Tripán. Após cada período de tratamento as células foram lavadas com PBS, deslocadas da placa com tripsina 1:10 e ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de SFB. As células permaneceram em meio de cultura com 10% de SFB pelo tempo de 30 minutos para que pudessem recompor e regenerar a membrana plasmática. A seguir adicionou-se o corante Azul de Tripán e as células foram contadas na Câmara de Neubauer em microscópio invertido (Leica). O número de células contadas variou de 100 a 150. Os ensaios foram realizados em triplicata. A determinação da porcentagem de células viáveis foi feita multiplicando-se o número total de células viáveis por 100, dividido pelo total de células contadas (viáveis e não-viáveis).

#### **4.7 Extração de RNA total**

O método utilizado foi o descrito por Chomezynski (1993). Foi extraído o RNA total das células com o auxílio do reagente Trizol<sup>®</sup>. Às células mantidas em microtubo foi adicionado 1mL de Trizol<sup>®</sup> (mantido a 4°C), sendo homogeneizadas com homogeneizador de tecidos (Tecnal, São Paulo, Brasil). Após 5 minutos em temperatura ambiente para a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas, foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Os

microtubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e centrifugados a 20.000 xg por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa sobrenadante contendo RNA foi transferida para um novo microtubo. Para a precipitação do RNA foram adicionados 500 µL de isopropanol e os tubos mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas (20.000xg, 30min, 4°C), o sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% foi adicionado para lavar o pellet de RNA, procedendo-se nova centrifugação por 5 minutos. Após retirada do sobrenadante, os microtubos são abertos em fluxo laminar, imersos em gelo, até secar o pellet que será ressuspensionado em 36 µL de água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

#### **4.8 Quantificação e integridade do RNA total extraído**

A quantificação das amostras de RNA foi realizada por espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE Healthcare). A razão das absorbâncias 260nm/280nm é usada para avaliar a pureza da amostra em RNA (razão ácido nucléico/proteína). Para determinar a integridade do RNA extraído, foi realizada eletroforese em gel agarose 1% com brometo de etídio em tampão TAE em cuba horizontal. Após a corrida, os géis foram fotografados para a avaliação das regiões 18S e 28S do RNA ribossomal e registro da imagem feita sob luz ultravioleta e com auxílio do programa *ChemiDoc TM MP System* será realizada a densitometria das bandas. O RNA isolado foi armazenado a -80°C até o momento de sua utilização.

#### **4.9 Desenho de oligonucleotídeos *sense* e *antisense* específicos para as citocinas e quimiocinas alvo**

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos *sense* e *antisense* para a amplificação do cDNA das citocinas interleucina-1β, interleucina-6; e quimiocinas interleucina-8, quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 (CXCL1) e quimiocina (C-C motif) ligante 2 (CCL2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e gene de controle interno (GAPDH). A qualidade no desenho dos



oligonucleotídeos apresenta um papel essencial na especificidade das reações de PCR quantitativo em tempo real, com mínima formação de *self-dimer* e alta especificidade pela sequência-alvo dão origem a resultados reprodutíveis e confiáveis. Oligonucleotídeos com uma tendência para a dimerização e heterodimerização reduzem significativamente a eficiência da reação e comprometem os resultados. O desenho dos oligonucleotídeos foi feito com auxílio do Software Primer Express (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de amplificação do cDNA dos genes mencionados estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação do cDNA dos genes-alvo

| CITOCINAS                                | SEQUÊNCIA SENSE               | SEQUÊNCIA REVERSE            | TEMPERATURA DE MELTING SENSE/ANTISENSE |
|--|-------------------------------|------------------------------|--|
| Interleucina-1 $\beta$<br>(XP_006712559) | 5'-CACCTGTACGATCACTGAACTG-3'  | 5'-ACCACTTGTTGCTCCATATCC-3'  | 61,9°C/61,8°C                          |
| Interleucina-6<br>(XP_005249802)         | 5'-AGCCCTGAGAAAGGAGACA-3'     | 5'-AGCCATCTTTGGAAGGTTTCAG-3' | 62,0°C /62,1°C                         |
| CXCL-1<br>(NM_001511)                    | 5'-AATTCACCCCAAGAACATCCAA-3'  | 5'-GTGTGGCTATGACTTCGGTTTG-3' | 62,3°C /63,0°C                         |
| TNF- $\alpha$<br>(NM_000594)             | 5'-TGGGATTCAGGAATGTGTGG-3'    | 5'-GTCAGGGATCAAAGCTGTAGG-3'  | 61,6°C /61,6°C                         |
| <b>CONTROLE ENDÓGENO</b>                 |                               |                              |  |
| GAPDH<br>(NM_001256799)                  | 5'-GTGGAAGGACTCATGACCACAGT-3' | 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'    | 65,4°C /63,2°C                         |

#### 4.10 PCR quantitativo em Tempo Real

A análise quantitativa de PCR em tempo real (RT-qPCR) foi realizada a fim de avaliar e comparar a expressão relativa dos genes referentes à interleucinas IL-6, IL-1 $\beta$ , quimiocinas CXCL1 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  na linhagem celular HEK-293. Para tanto foi utilizado o *Kit Power SYBR® Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems)*. Para detectar a expressão das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL1e fator de necrose tumoral  $\alpha$  e GAPDH (controle endógeno) foram utilizados os primers desenhados com auxílio do Software Primer Express (Applied Biosystems). Cada reação em tempo real foi realizada

utilizando cDNA equivalente a 1µg do RNA total de acordo com as condições sugeridas pelo fabricante, em um volume final de 20µL. Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Foram submetidos a 50 ciclos de amplificação em termociclador para PCR quantitativo em tempo real (*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*). Para quantificação foi empregado o método  $\Delta\Delta C_t$ , utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos,  $\Delta\Delta C_t$  foi normalizado para os controles e expresso em diferença de porcentagem. Neste método, fórmulas aritméticas são usadas para calcular a expressão relativas dos genes-alvo, comparados com um calibrador, por exemplo uma amostra controle (não-tratada). A normalização com o controle endógeno e controle negativo (amostra não-tratada) fornece a expressão relativa do gene-alvo dada por  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , onde  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$  (amostra) -  $\Delta C_T$  (amostra não-tratada), e  $\Delta C_T$  é o  $C_T$  do gene alvo subtraído do  $C_T$  do controle endógeno. A equação representa a expressão relativa normalizada do gene-alvo em uma amostra desconhecida, relativa à expressão da amostra não-tratada (GIULIETTI *et al.*, 2001).

#### **4.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas**

As determinações de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  foram realizadas em sobrenadantes de cultura de células HEK-293 no tempo de 6 horas realizadas por ELISA pelo método de captura, seguindo as especificações do fabricante (Qiagen, Duesseldorf, Germany). Os grupos analisados foram PBS, veneno total 50 µg/mL, LiRecDT1 100 µg/mL e LgRec1 50 µg/mL. As amostras foram centrifugadas a 1000 xg por 10 minutos e diluídas 1:2. Em seguida o experimento seguiu o protocolo conforme o *kit* colorimétrico *Multi-Analyte ELISArray*, da Qiagen. Primeiramente, fez-se a preparação de todos os reagentes necessários. Em seguida, adicionou-se 50 µL de tampão de ensaio em cada poço da placa, ao qual se somou 50 µL das amostras e controles positivos e negativos em seus respectivos poços, seguindo para incubação da placa por 2 horas. Após esse período, fez-se adição de 100 µL da solução de anticorpos de detecção e incubação de 1 hora. Foram novamente feitas 3 lavagens, às quais seguiu a adição de 100 µL de avidina-PRF (peroxidase de

raiz-forte) e incubação de 30 minutos. Seguiram-se 4 lavagens. Adicionou-se então 100 µL de solução de desenvolvimento e após incubação de 15 minutos ao abrigo da luz adicionou-se 100 µL de solução de parada da reação. As leituras das reações colorimétricas foram realizadas a 450 nm em leitor de microplacas e a correção do comprimento de onda foi feita através da subtração de leituras a 570 nm. O ensaio imunoenzimático escolhido fornece uma análise qualitativa e semi-quantitativa da expressão das proteínas em sobrenadante de cultivo celular, fornecendo uma comparação das amostras analisadas com o grupo controle (PBS) e o controle negativo calculando-se a diferença de densidade óptica.

#### **4.12 Dosagem de ureia e creatinina séricas**

A fim de avaliar parâmetros séricos da função renal, coletou-se sangue de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo tratado via intraperitoneal com 1,0 mg/kg de peso corporal das toxinas LiRecDT1, LiRecDT1 H12A, após 6 horas, 12 horas e 24 horas de exposição às toxinas. A coleta de sangue foi realizada através de punção cardíaca (sem anticoagulante) após anestesia dos animais com Cetamina, Xilazina e Acepromazina (COUTINHO, 1996).

Para a dosagem de creatinina em soro utilizou-se o kit Creatinina Cinética AA Líquida (Wiener Laboratórios, ARG) cujo princípio consiste na reação de Jaffé, que se baseia na formação de um cromógeno vermelho, produto da reação da creatinina com o picrato em meio alcalino. A intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de creatinina. A leitura espectrofotométrica foi realizada no comprimento de onda de 500 nm (KAPLAN E PESCE, 1996; HENRY 2001; KUSMA et al., 2008).

A dosagem de ureia sérica (Urea UV Cinética AA Líquida, Wiener Laboratórios, ARG) baseia-se no método indireto em que se mede a amônia criada a partir da ureia pela enzima urease. A enzima urease hidrolisa ureia em amônia e dióxido de carbono. Ao combinar amônia com 2-oxoglutarato e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) reduzido, a enzima glutamato desidrogenase (GLDH) oxida NADH em NAD<sup>+</sup>. A leitura espectrofotométrica foi

realizada no comprimento de onda de 340 nm. A diminuição da absorbância é proporcional à concentração de ureia na amostra (KAPLAN E PESCE, 1996; HENRY 2001; KUSMA et al., 2008).

#### **4.13 Perfil urinário**

Foi coletada urina com auxílio de uma micropipeta após leves massagens na região abdominal de ratos Wistar machos (Ensaio piloto- 2 animais por grupo) que receberam por via intraperitoneal 0,5 mg/kg e 1,0 mg/kg de peso corporal das toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, após 6 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas de exposição a toxina. Como controle negativo do experimento foi inoculado PBS. Usou-se tira reativa Combur-Test® (F. Hoffmann-La Roche, Suíça) (KUSMA et al., 2008) em Analisador Urisys 1100®.

#### **4.14 Pesquisa de proteinúria**

A fim de avaliar alterações da função renal, o conteúdo proteico da urina dos animais do grupo controle e dos grupos tratados foi avaliado. A dosagem da concentração de proteínas totais na urina dos animais foi realizada por meio do método de Azul de Coomassie, adaptado de BRADFORD (1976). O método baseia-se na diferença de coloração em que o Azul de Coomassie pode apresentar. Ao ligar-se à proteínas, o reativo passa da coloração vermelha para azul. A leitura da absorbância foi feita em comprimento de onda de 610 nm em leitor de placas de 96 wells (Meridian ELX 800). A curva padrão foi construída com diferentes concentrações (0 µg/mL – 200 µg/mL) de soro de Albumina Bovina (BSA) e as amostras foram diluídas para entrarem na região de linearidade da curva. Os pontos da curva e as amostras foram lidos em duplicatas. Foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida (SDS - PAGE) com concentração de 15% de acrilamida em condições redutoras e corados com Azul de Coomassie com a urina dos ratos tratados com o objetivo de confirmar a presença da alta concentração de proteínas na urina de ratos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 de forma concentração dependente e a ausência de proteinúria nos ratos do grupo tratado com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A.

#### **4.15 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas utilizando o teste Tukey, por meio do software GraphPad InStat (versão 3.0 / Windows 2000). Os valores  $\pm$  desvio padrão (SD) (ensaio *in vitro*) e erro padrão da média (SEM) (ensaio *in vivo*) foram utilizados (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ).

## 5. RESULTADOS

A fim de se determinar e quantificar a atividade esfingomielinásica das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1; estas foram submetidas ao ensaio de atividade fosfolipase-D utilizando-se o Amplex<sup>®</sup> Red Phospholipase D Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, USA). O objetivo deste ensaio foi de determinar e comparar a atividade enzimática das toxinas recombinantes expressas LiRecDT1 e LgRec1, a fim de garantir que estivessem ativas para o uso nos ensaios biológicos. O resultado está demonstrado na figura 2, onde verificamos que a LiRecDT1 e LgRec1 foram capazes de hidrolisar a esfingomielina. Podemos observar que a atividade esfingomielinásica da LgRec1 é maior do que da toxina LiRecDT1. Em estudo comparativo feito (BARBARO et al., 1996) com o veneno total de *L. intermedia* e *L. gaucho*, demonstrou-se que o veneno de *L. gaucho* apresenta maior atividade dermonecrótica quando comparado ao veneno de *L. intermedia*. Quando comparadas as atividades esfingomielinásicas dos venenos de *L. intermedia* e *L. gaucho*, demonstrou-se que ambos os venenos apresentam atividade esfingomielinásica e que esta é similar entre os venenos comparados, sendo que o veneno de *L. gaucho* apresenta uma atividade ligeiramente superior ao veneno de *L. intermedia* (BARBARO et al., 2005). Pode-se observar ainda que a toxina LiRecDT1 H12A apresenta atividade esfingomielinásica muito reduzida (CHAIM et al., 2011).

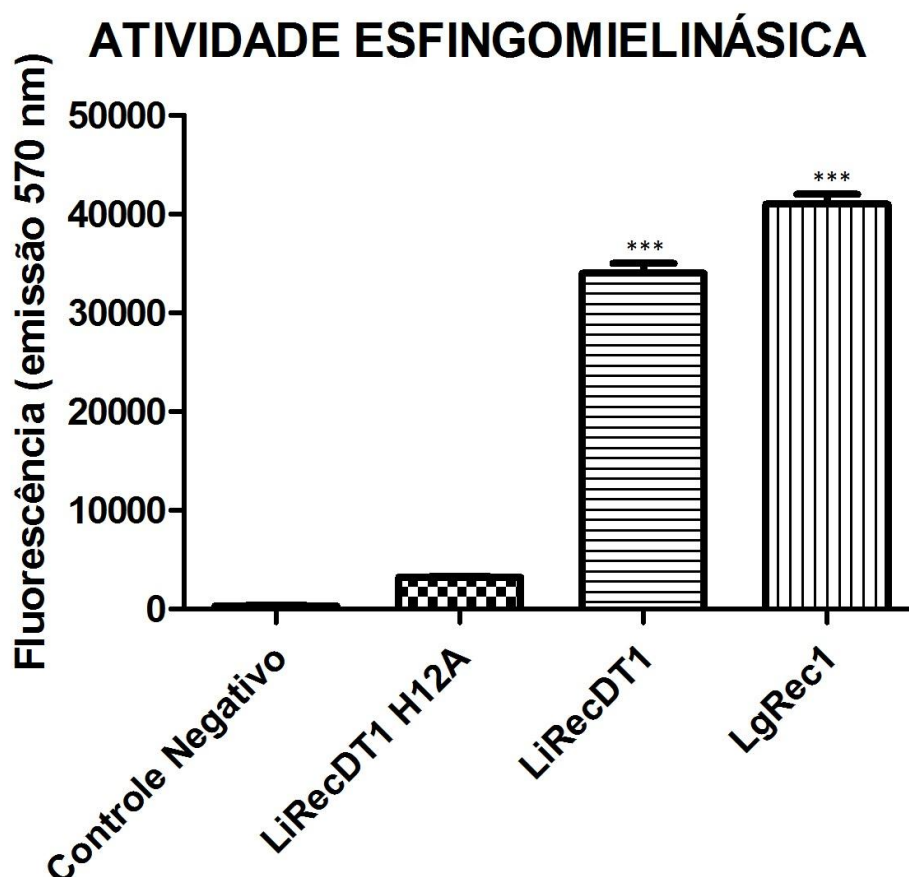


FIGURA 3: ENSAIO DE ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1 e LgRec1. A atividade esfingomielinásica foi avaliada através do kit Amplex® Red Phospholipase D Assay Kit a 37°C por 60 minutos, sendo o produto da reação determinada em 540nm, com detecção de emissão à 590nm. O experimento foi realizado em triplicata e os valores dados pela média  $\pm$  SEM expressos em porcentagem. A significância é definida como \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Após demonstrar que as proteínas estavam ativas (LiRecDT1 e LgRec1), foram realizados ensaios a fim de avaliar a expressão de citocinas e quimiocinas frente ao tratamento das células HEK-293 com as toxinas veneno total 50  $\mu\text{g/mL}$ , LiRecDT1 50  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ , LiRecDT1 H12A 100  $\mu\text{g/mL}$  e LgRec1 50  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$  e PBS. A toxina LiRecDT1 H12A foi utilizada com o intuito de avaliar se a sua ligação à membrana plasmática poderia induzir as células tratadas a expressar as citocinas e quimiocinas estudadas e se os possíveis efeitos da LiRecDT1 eram relacionados a sua atividade catalítica. A toxina LiRecDT1 H12A sofreu uma mutação sítio dirigida na enzima LiRecDT1, que resultou na substituição da histidina presente no sítio

ativo catalítico por uma alanina, originando a isoforma LiRecDT1 H12A. Esta toxina mutada apresenta uma redução drástica da atividade esfingomielinásica e uma capacidade reduzida em causar dermonecrose em pele de coelhos (Chaim, Da Silveira *et al.*, 2011). O PBS foi utilizado como controle negativo, uma vez que é o veículo, e o veneno total permite a comparação entre os efeitos de uma mistura complexa de toxinas com os efeitos das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1 isoladas. Após 6, 12 e 24 horas de incubação, foi extraído o RNA total das células da linhagem celular HEK-293 pelo método de TRIzol® (CHOMCZYNSKI, 1993).

O gel de agarose do RNA extraído apresentou duas bandas bem definidas referentes aos RNAs ribossômicos 18S e 28S (PROMEGA RNA Analysis Notebook). No perfil da eletroforese do RNA total (figura 4) pode-se observar a presença de bandas de pouca intensidade, visualizadas como um borrão, que correspondem aos RNAs mensageiros. A análise do gel de agarose demonstrou que o RNA extraído estava íntegro para a execução dos experimentos. O RNA total foi então dosado e avaliou-se a razão 260/280, a qual indica o grau de pureza da amostra em relação a contaminantes proteicos. A razão 260/280 quando superior a 1,8, foi considerada ideal para realizar o experimento, segundo Sambrook e Russel (2001).

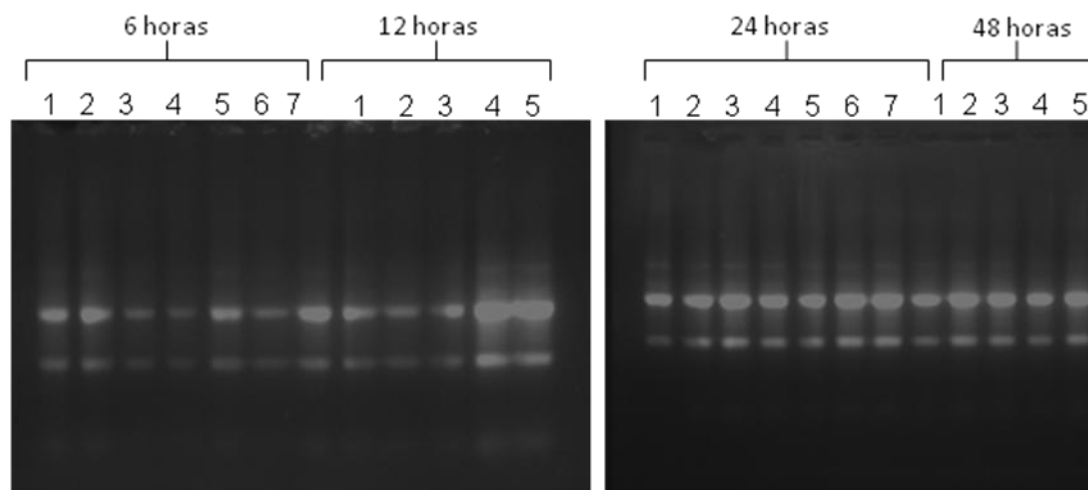


FIGURA 4: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA APÓS EXTRAÇÃO PELO MÉTODO DE TRIZOL. RNA total extraído da linhagem HEK-293. Os tempos de 6 e 24 horas abrangem os tratamentos em sequência (1-7) PBS, veneno 50 µg/mL, LiRecDT1M H12A 100µg/mL, LiRecDT1 50 µg/mL, LiRecDT1 100µg/mL, LgRec1 50 µg/mL e LgRec1 100µg/mL. Os tempos de 12 e 48 horas compreendem os tratamentos com PBS, veneno 50 µg/mL, LiRecDT1M H12A 100µg/mL, LiRecDT1 50 µg/mL e LiRecDT1 100µg/. Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo.



Em seguida, foram realizados testes para padronizar e otimizar os ensaios de PCR quantitativo Tempo Real. Para tal, optou-se pela utilização do kit Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-Step Kit, que possibilita quantificar o RNAm em apenas um passo, não sendo necessária a produção prévia de DNA complementar, o que aumenta a reprodutibilidade e sensibilidade das análises. Assim, o RT-PCR e o qPCR Tempo Real são realizados em uma mesma reação de PCR, sendo o RNA total utilizado como molde para essa reação.

Então, a fim de quantificar o RNAm referente às interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, quimiocina CXCL1 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  foram realizados ensaios de PCR quantitativo em Tempo Real utilizando as concentrações de oligonucleotídeos e RNA padronizadas. A padronização referente às concentrações de oligonucleotídeos testadas (200 nM, 400 nM e 600 nM) demonstrou que a concentração de 400 nM apresentava uma amplificação mais específica e eficiente. Para padronizar a concentração de RNA total, testou-se as concentrações de 10 ng, 50 ng, 100 ng e 1  $\mu$ g. A concentração de 100 ng demonstrou ser a melhor concentração para as reações de amplificação. Para quantificação, o método de escolha foi por comparação do  $C_t$  (cycle threshold). O método comparativo  $C_t$  ( $\Delta\Delta C$ ) demonstra a quantidade relativa do alvo nas amostras. Para tanto, o método considera a amplificação do alvo, controle endógeno e amostra referência. Em ciclos de amplificação,  $C_t$  (cycle threshold) é o nível de fluorescência acima da linha de base e no interior da região de crescimento exponencial, momento no qual a fluorescência é maior que o background. Os resultados são normalizados utilizando o controle endógeno, nesse caso o gene endógeno GAPDH. Desse modo é possível determinar a quantidade relativa do alvo em cada amostra (GIULIETTI et al., 2001).

As figuras 5-8 representam os gráficos referentes à expressão dos genes de interleucinas, IL-1 $\beta$ , IL-6, quimiocinas CXCL1 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  na linhagem celular HEK-293. Na figura 5 temos o gráfico referente à expressão de IL-1 $\beta$ . Após 6 horas de incubação, a expressão de RNAm de IL-1 $\beta$  nas células expostas ao veneno total aumentou cerca de 20 vezes,

LiRecDT1 50 µg/mL e 100 µg/mL demonstraram um aumento de 8 e 6 vezes respectivamente em relação à amostra controle mantida em PBS. Podemos observar que houve um aumento na expressão de IL-1β de sete vezes no tempo de 12 horas nas células HEK-293 incubadas com LiRecDT1 H12A . A exposição à toxina LiRecDT1 nas concentrações de 50 e 100 µg/mL induziu aumento na expressão de IL-1β em torno de doze e duas vezes respectivamente. Esse aumento da expressão da interleucina-1β foi significativo quando utilizados veneno total, LiRecDT1 H12A e LiRecDT1 50 e 100 µg/mL de nos tempos de 6 e 12 horas. 24 horas após a exposição, os níveis de expressão de IL-1β caíram novamente, sendo esses inferiores ao controle com PBS. Quando tratado com a LgRec1 foi possível observar um aumento significativo na expressão de IL-1β 6, 12 e 24 horas após o tratamento com 50 e 100 µg/mL da toxina. Após 12 horas, assim como ocorreu com a toxina dermonecrótica de *L. intermedia*, houve queda da expressão de IL-1β nas células incubadas com 50 µg/mL de LgRec1, porém não quando incubadas com 100 µg/mL de LgRec1.

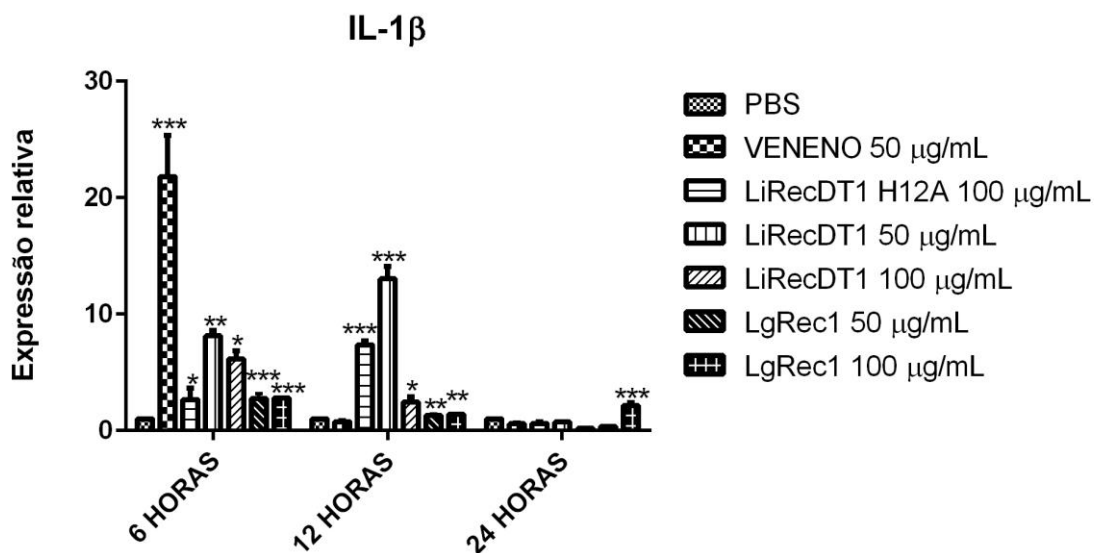


FIGURA 5: EXPRESSÃO RELATIVA DE IL-1B. Análise por PCR quantitativo em Tempo Real dos níveis de interleucina-1β na linhagem HEK-293 em 6, 12, 24 horas após o tratamento com veneno total, LiRecDT1M H12A 100 µg/mL, LiRecDT1 50 e 100 µg/mL e LgRec1 50 e 100 µg/mL. Para quantificação foi empregado o método  $\Delta\Delta Ct$ , utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos,  $\Delta\Delta Ct$  foi normalizado para os controles. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey (n=5), foram realizado um experimento único (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

Quando avaliamos a expressão relativa do fator de necrose tumoral-alfa frente aos tratamentos com veneno total, LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A (figura 6) observamos, após 6 e 24 horas, que o TNF- $\alpha$  apresenta um aumento significativo quando comparado com a célula tratada com o controle negativo PBS. Em 6 horas de tratamento foi possível detectar aumento de seis vezes na expressão de TNF- $\alpha$  para as células incubadas com veneno, oito vezes para as células que receberam LiRecDT1 H12A e cerca de 4 vezes para as células que estiveram em contato com LiRecDT1 100  $\mu\text{g/mL}$ . Ao final de 24 horas, é possível observar um aumento superior a vinte e cinco vezes na expressão de RNAm do fator de necrose tumoral- $\alpha$  frente a todos os tratamentos a que foi submetido. Quando as células foram submetidas ao tratamento com LgRec1 (figura 6), foi possível observar um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  após 12 horas de tratamento com a concentração mais alta da toxina. Assim como a LiRecDT1, os níveis de expressão de TNF- $\alpha$  caíram após 24 horas de tratamento.

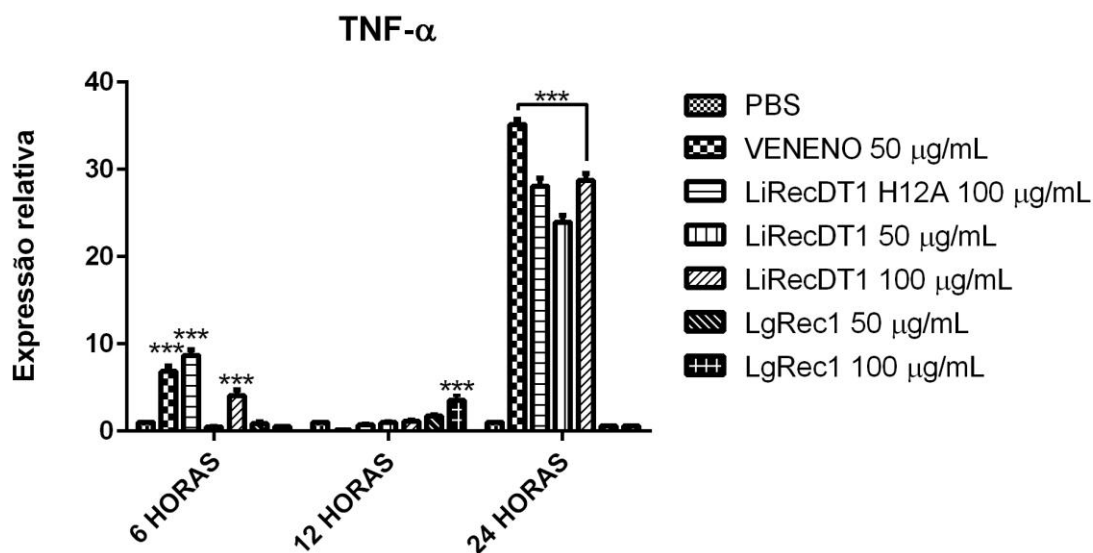


FIGURA 6: EXPRESSÃO RELATIVA DE TNF- $\alpha$ . Análise por PCR quantitativo em Tempo Real dos níveis de fator de necrose tumoral alfa na linhagem HEK-293 em 6, 12, 24 horas após o tratamento com veneno total, LiRecDT1M H12A 100  $\mu\text{g/mL}$  e LiRecDT1 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  e LgRec1 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Para quantificação foi empregado o método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos,  $\Delta\Delta\text{Ct}$  foi normalizado para os controles. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey (n=5), foram realizado um experimento único (\*\*\*) $p < 0.001$ .

Em relação à quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 (CXCL1) podemos observar diferença significativa de CXCL1 quando tratada com veneno total, toxina mutada, LiRecDT1 100 µg/mL e LgRec1 para as duas concentrações usadas no tempo de 6 horas. Observou-se resultado similar para o tempo de 12 horas, porém não houve diferença na expressão relativa para as duas concentrações usadas da toxina LiRecDT1. Para o tempo de 24 horas podemos observar aumento na expressão relativa de CXCL1 quando as células foram expostas ao veneno total, LiRecDT1 100 µg/mL e LgRec1 100 µg/mL no tempo de 24 horas (figura 7). Após 24 horas de tratamento com veneno total e LiRecDT1 100 µg/mL pode-se observar aumento na expressão relativa superior a 100 e 90 vezes respectivamente quando comparadas ao tratamento controle. Quando as células foram incubadas com a LgRec1 houve aumento da expressão da CXCL1 em todos os tempos de tratamento (figura 8). Nos tempos de 6 e 12 horas houve diferença na expressão de CXCL1 nas duas concentrações de LgRec1 usadas, diferente do que foi observado no tempo de 24 horas em que houve aumento de expressão relativa somente quando as células foram expostas à maior concentração da toxina.

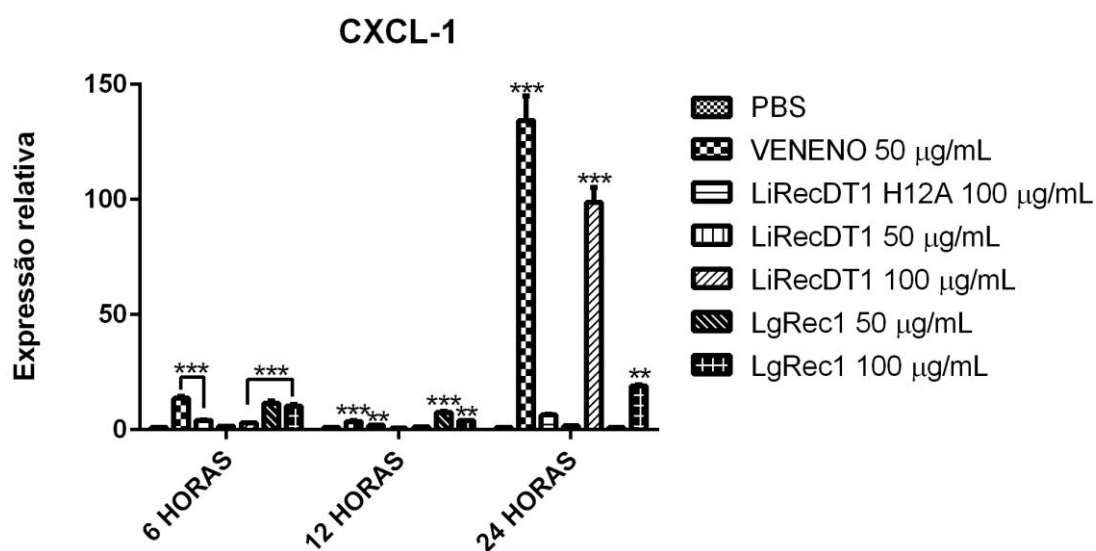


FIGURA 7: EXPRESSÃO RELATIVA DE CXCL-1. Análise por PCR quantitativo em Tempo Real dos níveis de fator de CXCL-1 na linhagem HEK-293 em 6, 12, 24 horas após o tratamento com veneno total, LiRecDT1M H12A 100 µg/mL, LiRecDT1 50 e 100 µg/mL e LgRec1 50 e 100 µg/mL. Para quantificação foi empregado o método  $\Delta\Delta C_t$ , utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos,  $\Delta\Delta C_t$  foi normalizado para os controles. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey (n=5), foram realizado um experimento único (\*\*\*) $p < 0.001$ .

Ao analisar a expressão da interleucina-6, pode-se observar que houve diferença significativa de expressão após 6, 12 e 24 horas de exposição ao veneno total. No tempo de 12 horas há aumento na expressão relativa superior a doze vezes. Quando incubadas com LiRecDT1, observou-se aumento na expressão de IL-6 no tempo de 12 horas. Para as duas concentrações avaliadas. O tratamento com LgRec1 demonstrou aumento na expressão relativa da IL-6 para as duas concentrações escolhidas, exceto para o tempo de 24 horas em que se observou diferença na expressão para a concentração de 100 µg/mL.

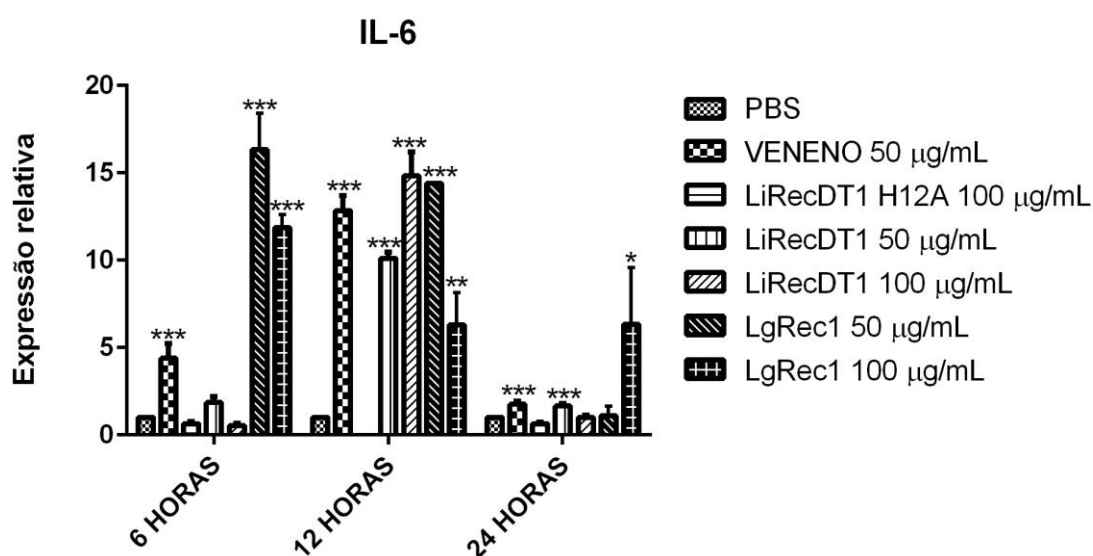


FIGURA 8: EXPRESSÃO RELATIVA DE IL-6. Análise por PCR quantitativo em Tempo Real dos níveis de fator de IL-6 na linhagem HEK-293 em 6, 12, 24 horas após o tratamento com veneno total, LiRecDT1 H12A 100 µg/mL, LiRecDT1 50 e 100 µg/mL e LgRec1 50 e 100 µg/mL. Para quantificação foi empregado o método  $\Delta\Delta C_t$ , utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos,  $\Delta\Delta C_t$  foi normalizado para os controles. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey ( $n=5$ ), foram realizado um experimento único (\*\* $p<0.001$ ).

Nas reações de PCR as amplificações se dão de maneira exponencial e ao final da ciclagem alcançam um platô. A quantificação pelo método Ct (cycle threshold) é definido como o ciclo da reação de PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador ultrapassa uma linha arbitrária denominada limiar. O limiar é delimitado na fase exponencial de amplificação, acima do

ruído de fundo e abaixo da fase de platô da reação de PCR. O valor numérico do Ct é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito de interesse, quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade inicial do transcrito na amostra (SAMBROOK e RUSSEL, 2001; GIULIETTI *et al.*, 2001). A tabela a seguir (2) demonstra resumidamente a diferença de expressão dos genes-alvo (+) em relação ao controle e o símbolo (-) refere-se ao fato de que não houve diferença de expressão quando comparado ao controle.

**Tabela 2:** Quadro representativo da expressão dos genes-alvo comparados ao controle PBS analisados por qPCR no tempo de 6, 12 e 24 horas.

|     |               | Veneno total | H12A | P1 50 µg/mL | P1 100 µg/mL | LgRec1 50 µg/mL | LgRec1 100 µg/mL |
|-----|---------------|--------------|------|-------------|--------------|-----------------|------------------|
|     |               | RNA          |      |             |              |                 |                  |
| 6 h | IL-1 $\beta$  | +            | -    | +           | +            | +               | +                |
|     | IL-6          | +            | -    | -           | -            | +               | +                |
|     | TNF- $\alpha$ | +            | +    | -           | +            | -               | -                |
|     | CXCL1         | +            | +    | -           | +            | +               | +                |
| 12h | IL-1 $\beta$  | -            | +    | +           | +            | +               | +                |
|     | IL-6          | +            | -    | +           | +            | +               | +                |
|     | TNF- $\alpha$ | -            | -    | -           | -            | -               | +                |
|     | CXCL1         | +            | +    | -           | -            | +               | +                |
| 24h | IL-1 $\beta$  | -            | -    | -           | -            | -               | +                |
|     | IL-6          | +            | -    | -           | +            | -               | +                |
|     | TNF- $\alpha$ | +            | +    | +           | +            | -               | -                |
|     | CXCL1         | +            | -    | -           | +            | -               | +                |

A detecção e quantificação da expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  foram feitos por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Tabela 3). Na figura pode-se observar os resultados da análise realizada com o sobrenadante das células HEK-293 expostas a veneno total 50  $\mu$ g/mL, LiRecDT1 100  $\mu$ g/mL e LgRec1 50  $\mu$ g/mL após 6 horas de exposição. Foram determinadas as diferenças de densidade óptica (D.O.) dos grupos expostos às toxinas comparados ao grupo controle PBS. Para a citocina IL-1 $\beta$  houve aumento superior a 2 vezes quando comparadas as densidades ópticas entre os grupos veneno, LiRecDT1 e para o grupo LgRec1 observou-se aumento superior a 4 vezes quando comparado ao grupo controle PBS. Para a citocina IL-6 houve aumento superior a 2 vezes quando comparadas as densidades ópticas entre os grupos veneno, e superior a 3 vezes para os grupos LiRecDT1 e LgRec1 quando comparados ao PBS. Observamos aumento na expressão da citocinas IL-8 frente ao veneno e às toxinas LiRecDT1 e LgRec1. Para o TNF- $\alpha$  observou-se aumento superior a 1 vez para o veneno e LiRecDT1 e superior a 2 vezes para a toxina LgRec1 quando comparado ao controle PBS no tempo de 6 horas. Por meio da técnica de PCR quantitativo Tempo Real foi possível demonstrar aumento na expressão de mRNA para IL-1 $\beta$  no tempo de 6 horas para células expostas ao veneno total, LiRecDT1 e LgRec1 100  $\mu$ g/mL, para IL-6 houve aumento na expressão de mRNA para células expostas ao veneno total e LgRec1 100  $\mu$ g/mL e para TNF- $\alpha$  demonstrou-se aumento na expressão de mRNA quando as células foram expostas ao veneno total e LiRecDT1 100  $\mu$ g/mL. O ensaio imunoenzimático demonstrou que o mRNA transcrito foi traduzido em proteína para os genes-alvo avaliados e estas proteínas foram detectadas em sobrenadante de cultivo celular. Assim, pode-se confirmar que o aumento de expressão de mRNA resultou em síntese de proteínas para o tempo avaliado.



TABELA 3: Diferença de expressão do nível de citocinas pelas células HEK-293 de cada grupo analisado após 6 horas de exposição. A relação foi calculada pela relação de D.O. com o controle PBS.

|               | CONTROLE NEGATIVO | PBS   | VENENO | RELAÇÃO DE D.O. | LiRecDT1 | RELAÇÃO DE D.O | LgRec1 | RELAÇÃO DE D.O |
|---------------|-------------------|-------|--------|-----------------|----------|----------------|--------|----------------|
| IL-1 $\beta$  | 0,035             | 0,023 | 0,056  | <b>2,43</b>     | 0,068    | <b>2,95</b>    | 0,112  | <b>4,86</b>    |
| IL-6          | 0,017             | 0,012 | 0,028  | <b>2,33</b>     | 0,038    | <b>3,16</b>    | 0,038  | <b>3,16</b>    |
| IL-8          | 0,037             | 0,016 | 0,038  | <b>2,375</b>    | 0,048    | <b>3,00</b>    | 0,044  | <b>2,75</b>    |
| TNF- $\alpha$ | 0,043             | 0,03  | 0,052  | <b>1,73</b>     | 0,046    | <b>1,53</b>    | 0,073  | <b>2,43</b>    |

Em seguida foi avaliada a viabilidade celular pelo método de exclusão com o azul de Tripan. A figura 9 mostra que houve diminuição significativa na viabilidade celular quando as células foram expostas ao veneno total após o tempo de 6 horas e 12 horas quando comparadas ao controle PBS. A fosfolipase D de *L. intermedia* 100  $\mu\text{g/mL}$  diminuiu a viabilidade celular das células HEK-293 em cultivo no tempo de 6 horas. Quando expostas à toxina LgRec1 50  $\mu\text{g/mL}$  há diminuição na viabilidade no tempo de 6 horas. Para LgRec1 100  $\mu\text{g/mL}$  observa-se diminuição na viabilidade celular para o tempo de 24 horas. Os resultados apresentados demonstram que as toxinas LiRecDT1 e LgRec1 apresentam atividade citotóxica para a linhagem HEK-293. Sabe-se que LiRecDT1 liga-se diretamente à membrana celular, causando formação de vacúolos citoplasmáticos, alterações morfológicas e apresenta atividade citotóxica direta concentração e tempo-dependente (CHAIM *et al.*, 2006). O efeito citotóxico das toxinas aqui demonstrado (figura 9) parece estar sendo revertido por métodos biológicos como renovação celular e o efeito da inflamação sobre o reparo ao dano tecidual.

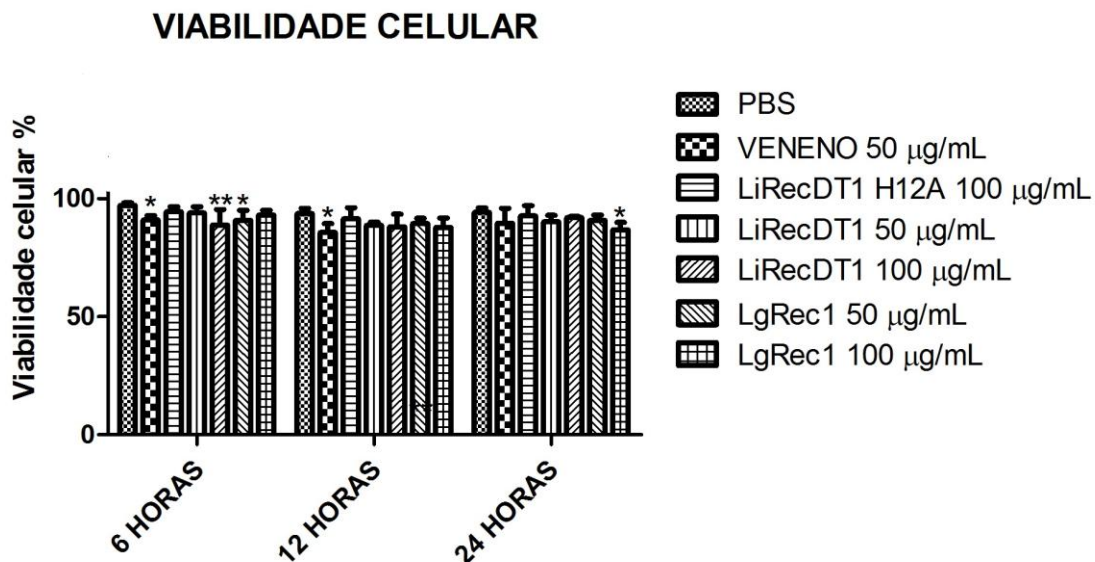


FIGURA 9: VIABILIDADE CELULAR. Células da linhagem HEK-293 expostas ao veneno total, LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e LgRec1 por 6, 12 e 24 horas foram coradas com azul de tripan. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey (n=3), foram realizados dois experimentos independentes (\*p<0,05).

Com o objetivo de avaliar a nefrotoxicidade em modelo animal (ratos Wistar machos) foi primeiramente analisada a composição bioquímica da urina dos animais frente à aplicação por via intraperitoneal de 1,0 mg/kg de peso corporal das toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1M H12A e 0,5 mg/kg de veneno total. Para o controle do experimento usou-se o tampão PBS. Após 6 horas, 12 horas, 24 horas de exposição às toxinas, a urina foi coletada e a composição bioquímica analisada por tiras reativas Combur-Test® (Roche, Switzerland). As tabelas 4-6 mostram o perfil urinário dos animais tratados.

Foi também avaliado o perfil urinário dos animais tratados com a LiRecDT1 1,0 mg/kg e LiRecDT1 H12A 1,0 mg/kg, 0,5 mg/kg de veneno total e grupo controle. Após 6 horas de tratamento foi observada hematúria e hemoglobínúria em dois animais tratados com LiRecDT1 1,0 mg/kg e presença de leucócitos (leucocitúria) em 4 dos animais expostos a fosfolipase D de *L. intermedia* (tabela 4). A presença de eritrócitos íntegros na urina foi feita por meio de microscopia de luz. Quando expostos ao veneno total (tabela 5), os animais apresentaram hematúria, hemoglobínúria e leucocitúria, e perfil de

aumento de proteínas na urina (proteinúria) se comparado com o controle negativo PBS. Os animais que receberam a toxina recombinante LiRecDT1 H12A apresentaram um perfil urinário semelhante ao grupo controle.

Após 12 horas de tratamento torna-se evidente a presença de sangue, leucócitos e glicose na urina dos animais que receberam LiRecDT1 e veneno total se comparados ao controle (tabela 5). Dois animais do grupo LiRecDT1 H12A apresentaram hemoglobinúria. Os animais tratados com LiRecDT1 e veneno total apresentaram sangue, leucócitos e glicose aumentados na urina (tabela 6) após 24 horas de exposição. Os animais que receberam a toxina recombinante LiRecDT1 H12A apresentaram um perfil urinário semelhante ao grupo controle.

**Tabela 4:** Perfil urinário de ratos Wistar machos que receberam PBS (grupo controle), LiRecDT1M H12A 1,0 mg/kg, LirecDT1 1,0 mg/kg e Veneno total 1,0 mg/kg (n=5) após 6 horas após injeção.

|   | <b>PBS</b>    | <b>H12A</b>   | <b>LiRecDT1</b>           | <b>Veneno total</b>      |
|---|---------------|---------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>SANGUE</b>                           | NEGATIVO      | NEGATIVO      | ++ (1); ++++ (1); NEG (3) | ++ (5)                   |
| <b>BILIRRUBINA</b>                      | NEGATIVO      | NEGATIVO      | NEGATIVO                  | NEGATIVO                 |
| <b>UROBILINOGÊNIO</b>                   | NORMAL        | NORMAL        | NORMAL                    | NORMAL                   |
| <b>CORPOS CETÔNICOS</b>                 | NEGATIVO      | NEGATIVO      | NEGATIVO                  | + (3); NEG (2)           |
| <b>PROTEÍNAS mg/dL</b>                  | NEGATIVO      | NEGATIVO      | NEGATIVO                  | + (2); NEG (3)           |
| <b>NITRITO</b>                          | NEGATIVO      | NEGATIVO      | NEGATIVO                  | NEGATIVO                 |
| <b>GLICOSE</b>                          | NEGATIVO      | NEGATIVO      | + (3); NEG (2)            | NEGATIVO                 |
| <b>pH</b>                               | 6.0 - 7,0     | 6.0           | 7.0 - 8.0                 | 7.0                      |
| <b>DENSIDADE</b>                        | 1.015 - 1.020 | 1.020 - 1.025 | 1.010 - 1.015             | 1.015 – 1.020            |
| <b>LEUCÓCITOS WBC/<math>\mu</math>L</b> | NEGATIVO      | NEGATIVO      | ++ (4); NEG (1)           | ++ (3); +++ (1); NEG (1) |

**Tabela 5:** Perfil urinário de ratos Wistar machos que receberam PBS (grupo controle), LiRecDT1M H12A 1,0 mg/kg, LirecDT1 1,0 mg/kg e Veneno total 1,0 mg/kg (n=5) após 12 horas após injeção.

|                         | <b>PBS</b> | <b>H12A</b> | <b>LiRecDT1</b>         | <b>Veneno total</b> |
|-------------------------|------------|-------------|-------------------------|---------------------|
| <b>SANGUE</b>           | NEGATIVO   | NEGATIVO    | + (2); +++ (1); NEG (1) | +++ (4); NEG (1)    |
| <b>BILIRRUBINA</b>      | NEGATIVO   | NEGATIVO    | NEGATIVO                | NEGATIVO            |
| <b>UROBILINOGÊNIO</b>   | NORMAL     | NORMAL      | NORMAL                  | NORMAL              |
| <b>CORPOS CETÔNICOS</b> | NEGATIVO   | NEGATIVO    | + (4); NEG (1)          | NEGATIVO            |
| <b>PROTEÍNAS mg/dL</b>  | NEGATIVO   | NEGATIVO    | NEGATIVO                | NEGATIVO            |
| <b>NITRITO</b>          | NEGATIVO   | NEGATIVO    | NEGATIVO                | NEGATIVO            |
| <b>GLICOSE</b>          | NEGATIVO   | NEGATIVO    | + (1); +++ (4)          | ++ (4); NEG (1)     |
| <b>pH</b>               | 6.0 – 8.0  | 6.5 - 7.0   | 6.0 - 6.5               | 6.5 - 7.0           |

|   |               |               |                 |                  |
|---|---------------|---------------|-----------------|------------------|
| <b>DENSIDADE</b>                        | 1.010 – 1.020 | 1.005 – 1.015 | 1.015 - 1.020   | 1.015 – 1.020    |
| <b>LEUCÓCITOS WBC/<math>\mu</math>L</b> | NEGATIVO      | NEGATIVO      | ++ (3); NEG (2) | +++ (4); NEG (1) |

**Tabela 6:** Perfil urinário de ratos Wistar machos que receberam PBS (grupo controle), LiRecDT1M H12A 1,0 mg/kg, LirecDT1 1,0 mg/kg e Veneno total 1,0 mg/kg (n=5) após 24 horas após injeção.

|   | <b>PBS 24h</b> | <b>H12A 24H</b> | <b>LiRecDT1</b> | <b>Veneno total</b>      |
|---|----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| <b>SANGUE</b>                           | NEGATIVO       | NEGATIVO        | + (1); ++ (4)   | ++ (4); NEG (1)          |
| <b>BILIRRUBINA</b>                      | NEGATIVO       | NEGATIVO        | NEGATIVO        | NEGATIVO                 |
| <b>UROBILINOGÊNIO</b>                   | NORMAL         | NORMAL          | NORMAL          | NORMAL                   |
| <b>CORPOS CETÔNICOS</b>                 | NEGATIVO       | NEGATIVO        | NEGATIVO        | NEGATIVO                 |
| <b>PROTEÍNAS mg/dL</b>                  | NEGATIVO       | NEGATIVO        | NEGATIVO        | NEGATIVO                 |
| <b>NITRITO</b>                          | NEGATIVO       | NEGATIVO        | NEGATIVO        | NEGATIVO                 |
| <b>GLICOSE</b>                          | NEGATIVO       | NEGATIVO        | + (5)           | NEGATIVO                 |
| <b>pH</b>                               | 6.0            | 6.0 – 6.5       | 6.0 - 7.0       | 5.0 - 6.0                |
| <b>DENSIDADE</b>                        | 1.020 – 1.030  | 1.015 - 1.020   | 1.015 - 1.020   | 1.015 – 1.020            |
| <b>LEUCÓCITOS WBC/<math>\mu</math>L</b> | NEGATIVO       | NEGATIVO        | ++ (5)          | ++ (2); +++ (2); NEG (1) |

A fim de confirmar e quantificar a presença de proteína na urina (proteinúria) foi realizado o ensaio de Bradford (1976) com as urinas dos animais tratados. Quando em pH ácido, o corante aniônico Coomassie Blue forma complexo com proteínas que contenham aminoácidos básico e/ou aromáticos. A interação entre a proteína e o corante gera alteração no comprimento de onda de absorção máxima do corante (465 nm- corante livre) para 595 nm (corante complexado à proteína). É um método de escolha para quantificação de proteínas, utilizado aqui para confirmar o resultado das tiras reativas. A figura 10 representa o resultado da dosagem de proteínas na urina dos animais submetidos ao experimento. Podemos observar um aumento da quantidade de proteínas na urina em 6 horas após tratamentos com veneno total quando comparado ao grupo controle. Após 12 horas foi possível ainda verificar presença aumentada de proteína na urina quando os animais foram injetados com LiRecDT1 1,0 mg/kg. Após 24 horas podemos observar diferença significativa na concentração de proteína na urina no grupo inoculado com veneno total quando comparado ao grupo controle.

Por meio de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida gradiente 3-20% (figura 11) com as amostras de urina coletadas dos animais submetidos ao experimento, podemos observar uma diferente concentração de proteína na urina dos animais controle e dos animais que receberam a toxina mutada H12A em relação aos animais que receberam a toxina dermonecrótica LiRecDT1 e veneno total. Em análise qualitativa das proteínas das amostras de urina dos ratos pode-se observar concentração de proteínas de baixo peso molecular (<35kDa) nos ratos injetados com veneno total e LiRecDT1. Os animais que receberam LiRecDT1 apresentam maior concentração de proteínas na urina, resultado evidenciado nos tempos de 12 horas após exposição à toxina. Após 12 horas, pode-se observar a presença de uma banda densa na altura de 66 kDa, referente ao perfil eletroforético da albumina (massa molecular de aproximadamente 67 kDa) nos animais que receberam LiRecDT1. Após 24 horas de exposição ao veneno total, fica evidente a presença de grande quantidade de proteínas na urina. Apesar de apresentar um perfil semelhante ao veneno total, os animais expostos a LiRecDT1 (24 horas) não apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle PBS.

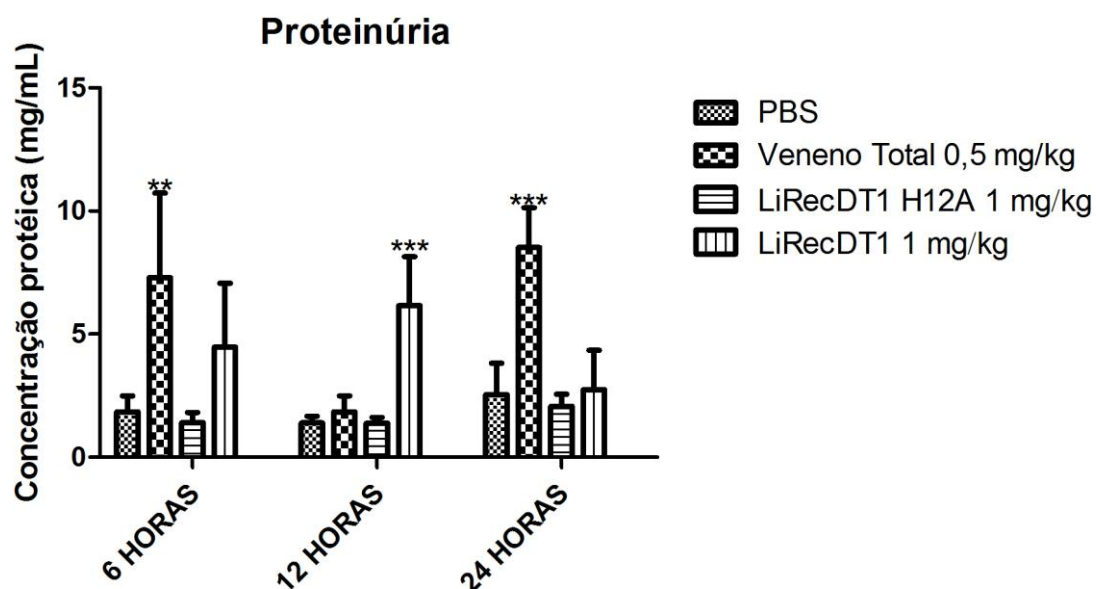


FIGURA 10: PESQUISA DE PROTEINÚRIA. Ratos Wistar machos receberam injeções intraperitoneais de toxina dermonecrótica LiRecDT1, LiRecDT1 H12A na concentração de 1,0 mg/kg e veneno total 0,5 mg/kg de peso corporal e após 6h, 12h e 24h de tratamento a urina foi recolhida e realizada a determinação da concentração de proteínas segundo o método de Bradford (Azul brilhante de Coomassie). Valores indicados são a média  $\pm$  SEM. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey ( $n=3$ ), foram realizado um experimento único (\*\* $p<0.001$ ).

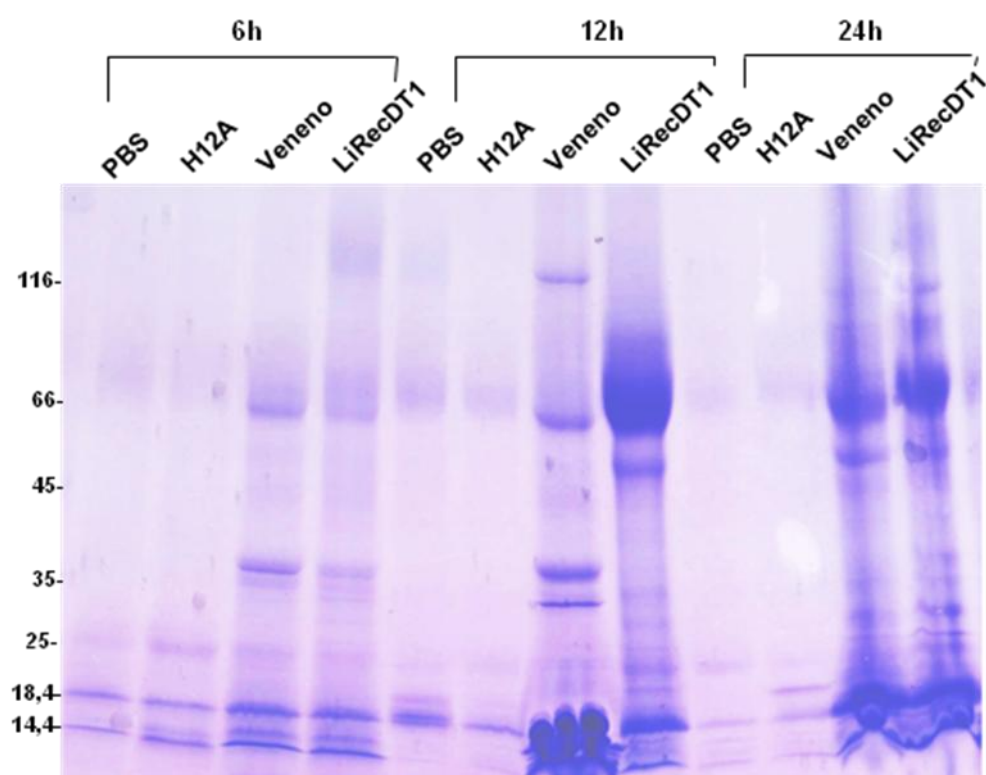


FIGURA 11: PESQUISA DE PROTEINÚRIA. Amostras de urinas coletadas após 6, 12 e 24 horas de ratos controle (PBS), LiRecDt1 H12A 1,0 mg/kg, Veneno total 0,5 mg/kg e LiRecDT1

1,0 mg/kg (n=5), separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) gradiente 3-20% em condições redutoras e corados com Azul de Coomassie. Para o preparo das amostras usou-se 10 µL de urina.

Com o objetivo de determinar efeitos nocivos atribuídos à toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 na concentração de 1,0 mg/kg e veneno total 0,5 mg/kg de peso corporal nos tempos de 6 horas, 12 horas e 24 horas de tratamento, utilizamos parâmetros bioquímicos de creatinina e de uréia sérica de ratos Wistar machos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1. Conforme mostrado na figura 12, a creatinina sérica foi significativamente aumentada em ratos Wistar machos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 1,0 mg/kg após 12 e 24 horas de tratamento em comparação aos ratos do grupo controle (PBS). Os valores séricos de uréia apresentaram diferença significativa nos tempos de 6 horas para os ratos que receberam veneno total e 6 e 12 horas para os animais que receberam LiRecDT1.

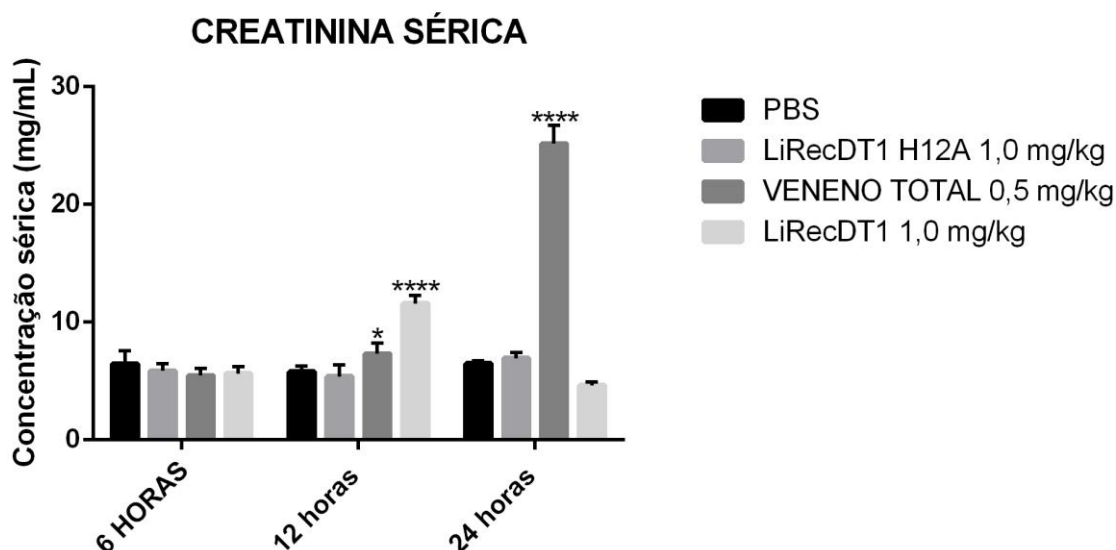


FIGURA 12: DOSAGEM DE CREATININA SÉRICA. Ratos Wistar machos receberam injeções intraperitoneais de toxina dermonecrótica LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A na concentração de 1,0 mg/kg de peso corporal e veneno total 0,5 mg/kg e após 6h, 12h e 24h de tratamento o sangue foi coletado e a concentração de creatinina no soro mensurada. Valores indicados são a média  $\pm$  SEM. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey (n=5), foram realizado um experimento único (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



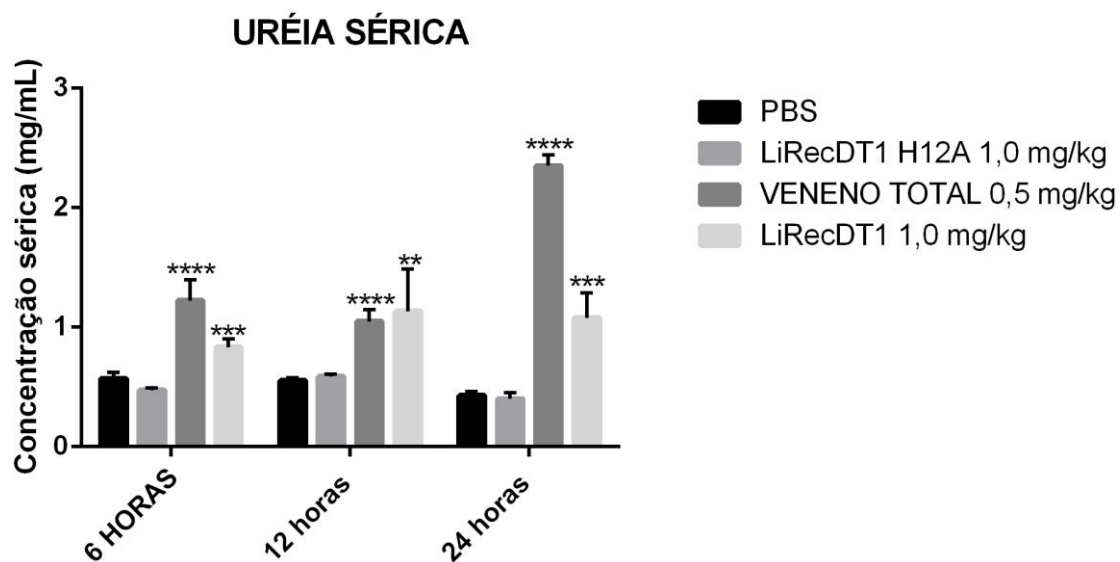


FIGURA 13: DOSAGEM DE URÉIA SÉRICA. Ratos Wistar machos receberam injeções intraperitoneais de toxina dermonecrótica LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A na concentração de 1,0 mg/kg de peso corporal e veneno total 0,5 mg/kg e após 6h, 12h e 24h de tratamento o sangue foi coletado e a concentração de uréia no soro mensurada. Valores indicados são a média  $\pm$  SEM. Os dados obtidos foram analisados utilizando One-way ANOVA utilizando pós teste de Tukey (n=5), foram realizado um experimento único (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Os processos patológicos nos rins podem refletir perturbações hematológicas, tais como hemólise e coagulação intravascular disseminada e reação inflamatória sistêmica, causadas pelo envenenamento, o que pode conduzir a insuficiência renal (FUTRELL, 1992; WILLIAMS *et al*, 1995; LUNG E MALLORY, 2000). No entanto, não existem dados experimentais suficientes que confirmem tal hipótese. Por outro lado, já foi observado que distúrbios renais podem ser consequência dos componentes tóxicos do veneno que atuam diretamente em células renais ou estruturas como glomérulos e túbulos (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008), como também demonstrado em vários outros venenos (BJARNASON *et al.*, 1995).

Células da linhagem HEK-293 foram expostas *in vitro* às toxinas LgRec1 (*Loxosceles gaucho*), LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e veneno total de *L. intermedia* com o objetivo de excluir a participação do sistema imune, inflamação sistêmica, no processo de citotoxicidade de células renais. Por meio da análise da expressão dos genes interleucinas, IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL1 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  na linhagem celular HEK-293 por reações de PCR quantitativo tempo real, buscou-se determinar um perfil de expressão de interleucinas e quimiocinas após tratamento com as toxinas LiRecDT1, LgRec1, LiRecDT1M H12A e com o veneno total.

Objetivando quantificar o mRNA referente às citocinas IL-1  $\beta$  , IL-6, TNF- $\alpha$  e CXCL-1 foi realizado ensaio de PCR tempo real. Pode-se observar um aumento (maior do que vinte vezes) de expressão da interleucina-1 $\beta$  tratada com veneno, LiRecDT1 50  $\mu$ g/mL (sete vezes) e LiRecDT1 100  $\mu$ g/mL (seis vezes) após 6 horas de incubação. No tempo de 12 horas houve diferença significativa para os tratamentos com LiRecDT1 H12A e LiRecDT1 50 e 100  $\mu$ g/mL. Foi evidente uma maior quantidade de mRNA para IL-6 quando as células HEK-293 foram expostas ao veneno total, LiRecDT1 e LgRec1. Observamos ainda que o mRNA do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) apresenta diferença significativa após 6 e 24 horas frente à incubação com veneno total, LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e após 12 horas na presença de LgRec1. Para CXCL-1 observou-se maior quantidade de mRNA para as células expostas a veneno total, fosfolipase D de *L. intermedia* e LiRecDT1H12A e LgRec1.

Para quantificar a expressão de citocinas secretadas para o sobrenadante das células realizou-se ensaio imunoenzimático. Podemos observar que houve aumento na expressão de proteínas referente às citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF-  $\alpha$  após 6 horas de incubação. Assim, pudemos demonstrar que houve aumento na concentração intracelular de mRNA e consequente aumento na concentração proteínas referentes às citocinas no sobrenadante celular.

Relacionado ao aumento na expressão de mRNA das citocinas observou-se diminuição na viabilidade das células quando em contato com veneno total, LiRecDT1 e LgRec1. IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$  são conhecidos por ativar leucócitos, induzir a expressão de outros mediadores inflamatórios, aumentar a expressão de moléculas de adesão, contribuindo para a migração de leucócitos (SANCHEZ-NINO *et al.*, 2010; SMITH, 2007). Como já foi descrito (AKCAY *et al.*, 2009; ORTEGA *et al.*, 2010; ZAGER *et al.*, 2006), essas citocinas encontram-se mais expressas em casos de IRA, determinando um perfil característico de expressão de citocinas, indicando um quadro de IRA. IL-6 é uma interleucina pleiotrópica, com propriedades principalmente pró-inflamatórias. É produzida em grande quantidade pelas células endoteliais em resposta a estímulos pró-inflamatórios como TNF-  $\alpha$  e também é uma resposta ao dano tecidual e falência orgânica, atuando através de seu receptor celular (AHLSTROM *et al.*, 2004; BORISH *et al.*, 2006; DINARELLO, 2007; SHAIKH, 2011).

Quando comparamos os perfis de expressão de citocinas resultantes da incubação com LiRecDT1 e LgRec1, vê-se que a fosfolipase D de *L. intermedia* induz a expressão de IL-1 $\beta$  em perfil semelhante a LgRec1 nos tempos de 6 e 12 horas. Quando analisado após 24 horas, apenas LgRec1 foi capaz de induzir a expressão de mRNA da interleucina 1 $\beta$ . Para a citocina IL-6, LgRec1 induziu as células HEK-293 a expressarem mRNA correspondente em todos os tempos avaliados. LiRecDT1 obteve o mesmo resultado apenas no tempo de 12 horas. LiRecDT1 induziu a expressão de mRNA da citocina TNF- $\alpha$  após 6 e 24 horas de incubação. Para LgRec1, o mesmo resultado foi observado após 12 horas. Quando avaliamos a expressão de CXCL1, LgRec1 aumentou a expressão de mRNA em todos os tempos avaliados, enquanto que LiRecDT1 demonstrou aumento na expressão nos tempos de 6 e 24 horas. Esses

resultados demonstram um perfil de expressão de mRNA de citocinas diferenciado quando comparamos a diferença de expressão e a variável tempo entre as toxinas LiRecDT1 e LgRec1. Pode-se inferir ainda que a LgRec1 mostrou ser mais efetiva ao induzir a expressão das citocinas analisadas. Desmonstrou-se que a LgRec1 apresenta atividade esfingomielinásica superior à LiRecDT1 e que o veneno total de *L. gaucho* apresenta maior atividade dermonecrótica (BARBARO *et al.*, 2005).

Perfis de expressões genéticas de fibroblastos humanos tratados com isoforma recombinante I de *L. reclusa* (SMD) mostraram regulação positiva de genes relacionados à citocinas humanas e genes envolvidos no metabolismo de glicoesfingolipídios. Em experimentos *in vitro*, fibroblastos expostos às toxinas do veneno loxoscélico sofrem alterações na expressão e secreção de moléculas sinalizadoras como interleucinas (IL-6, IL-8, IL-1B), citocinas quimiotáticas e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (DRAGULEV *et al.*, 2007).

Uma série de citocinas e mediadores pró-inflamatórios são liberados após exposição a toxinas com atividade enzimática (SITPRIJA, 2008). Foi possível observar um aumento na expressão relativa de citocinas pró-inflamatórias após tratamento com as toxinas LiRecDT1 e LgRec1 conhecidas por apresentarem atividade enzimática. Processos inflamatórios mediados por citocinas pró-inflamatórias tem sido implicados na patogênese da lesão renal aguda e doença renal crônica, em que células epiteliais e endoteliais e tecidos danificados estão associados com a liberação de alguns mediadores que podem iniciar a cascata inflamatória. A ativação de células epiteliais e endoteliais resultam na supra-regulação de uma variedade de quimiocinas e citocinas, incluindo IL-1, IL-6, IL-8, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (ORTEGA *et al.*, 2010).

A expressão relativa da quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 (CXCL1) demonstrou diferença significativa quando tratada com LiRecDT1 e LgRec1. As quimiocinas atuam como fatores quimiotáticos, induzindo o deslocamento de neutrófilos polimorfonucleares para o tecido lesado, promovendo inflamação intersticial nas infecções renais (HUNG *et al.*, 2006). Diferentes citocinas e quimiocinas participam da ativação e migração de leucócitos do sangue periférico para os tecidos inflamados, aumentando ou reduzindo a reatividade e alterando a expressão de receptores celulares (SEGERER *et al.*, 2000). Dentre

as citocinas liberadas nos tecidos nas fases iniciais da citotoxicidade celular estão o os membros da família das citocinas quimioatraentes, as quimiocinas (GRYGORCZUK *et al.*, 2004; STANDIFORD *et al.*, 1995).

HORTA e colaboradores (2013) investigaram o papel de receptores do ácido lisofosfatídico na liberação de citocinas e quimiocinas em fibroblastos tratados com veneno de *L. similis*. Demonstraram dados que indicam que ácido lisofosfatídico formado por fosfolipase-D do veneno total de *L. similis* e toxina recombinante LiRecDT1 induzem a liberação de citocinas interleucina-6, interleucina-8 e quimiocinas, CXCL1 e CXCL2, mediados por receptores LPA. Diversos estudos ressaltam que os mecanismos vinculados à ativação da resposta inflamatória exacerbada são verificados experimentalmente principalmente com toxinas dermonecróticas do veneno loxoscélico que possuem atividade fosfolipásica (VAN MEETEREN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005).

A LiRecDT1 H12A, a qual sofreu a substituição na posição 12 de um resíduo de histidina por alanina, apresenta uma atividade catalítica considerada reduzida, diminuindo consideravelmente sua atividade dermonecrótica, hemolítica e baixa resposta inflamatória. A mutação aminoacídica sítio dirigida desestabiliza ou desorganiza o sítio catalítico da proteína dermonecrótica, assim desencadeando uma atividade catalítica residual (KUSMA *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011). O fato de observarmos que a toxina LiRecDT1 H12A induziu a expressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 juntamente com ensaios em modelos animais que não desenvolvem lesões dermonecróticas após envenenamento por *Loxosceles sp.* (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004), aliado a dados que demonstram a ligação das toxinas do veneno em estruturas renais após o envenenamento (LUCIANO *et al.*, 2004) confirmam a atividade nefrotóxica das toxinas do veneno devido a uma ação direta como “toxinas plantadas” às estruturas renais (COTRAN *et al.*, BARBOSA *et al.*, 2002; BOER-LIMA *et al.*, 2002; CHAIM *et al.*, 2006). Esse resultado pode ainda ser explicado pelo fato de que a toxina LiRecDT1 H12A em altas concentrações apresenta atividade enzimática ainda que residual (CHAIM *et al.*, 2011; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; WILLE *et al.*, 2013).

LUCIANO e colaboradores (2004) demonstraram que o veneno total de *L. intermedia* induz dano renal direto por meio da ligação e deposição de toxinas do veneno em estruturas renais como os glomérulos e túbulos, bem como na membrana basal glomerular. Porém, observaram que há ausência de resposta inflamatória no tecido renal. Por meio da demonstração de dados laboratoriais, bioquímicos e morfológicos de estruturas renais de camundongos expostos ao veneno de *Loxosceles intermedia*, juntamente com a ligação das toxinas do veneno em estruturas renais, confirmaram a atividade nefrotóxica das toxinas do veneno e a hipótese da ação direta como “antígenos plantados” às estruturas renais (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006). CHAIM e colaboradores (2006) reportaram o efeito nefrotóxico direto como sendo significativamente induzido em especial pela toxina recombinante LiRecDT1 obtida da biblioteca de cDNA de *L. intermedia*. Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando camundongos e linhagem celular epitelial renal canina (MDCK) demonstraram atividade nefrotóxica direta, além de alterações morfológicas incluindo vacúolos citoplasmáticos, adesão defeituosa ao substrato e adesão célula-célula, além de alteração da viabilidade celular. Técnicas de imunofluorescência utilizando anticorpos que reconhecem a toxina dermonecrótica recombinante, revelaram deposição e ligação desta toxina em estruturas renais. A toxina recombinante foi capaz de reproduzir quase completamente o efeito nefrotóxico causado pelo veneno total.

Em ensaios *in vivo* com a toxina LiRecDT observou-se efeitos acentuados sobre estruturas renais, acúmulo de material proteináceo no lúmen, extravasamento de eritrócitos para o espaço de Bowman, porém não foi demonstrado formação de infiltrado leucocitário nas estruturas renais, sugerindo um efeito citotóxico direto sem a presença e contribuição do efeito inflamatório secundário resultante do local de inoculação do veneno. Assim, seria uma reação do tecido renal exposto à toxina LiRecDT (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006). O aumento na expressão de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e CXCL-1, aliado à função que essas citocinas exercem na sinalização e recrutamento de células de defesa evidenciam o efeito citotóxico das toxinas LiRecDT1 e LgRec1 na linhagem HEK-293. KUSMA e colaboradores (2008) demonstraram atividade nefrotóxica da toxina recombinante LiRecDT1 depende da atividade catalítica de fosfolipase D sobre o tecido renal.

Camundongos expostos a fosfolipase-D recombinante LiRecDT1 apresentaram edema nas estruturas renais como glomérulo, cápsula de Bowman e túbulos renais, eritrócitos na cápsula de Bowman, citotoxicidade demonstrada por desordens em pedicelos e endotélio fenestrado. Urinálises demonstraram hematúria e elevação de ureia sérica. Alterações da função renal como alcalinização da urina, hematúria, azotemia e a associação com as alterações histopatológicas, evidenciam o efeito nefrotóxico causado pelo veneno de aranhas marrons. Dados reportaram lesão renal após exposição ao veneno de *Loxosceles gaucho* com achados de rabdomiólise (presença de mioglobinúria), vasoconstrição renal, diminuição do fluxo sanguíneo renal e diminuição da taxa de filtração glomerular (LUCATO *et al.*, 2011).

O exame de urinálise feito nas urinas de ratos Wistar machos que foram injetados com LiRecDT1 mostrou proteinúria, hematúria (eritrócitos íntegros), hemoglobinúria e leucocitúria. As tiras reagentes detectam a porção heme da molécula de hemoglobina e mioglobina. A hemoglobinúria indica a presença de hemoglobina na urina, pode ocorrer quando eritrócitos intactos sofrem lise em urina extremamente diluída (densidade inferior à 1.008) ou quando há níveis elevados de hemoglobina no sangue decorrente de hemólise intravascular. Hemoglobina livre passando diretamente o glomérulo para o ultrafiltrado é pouco comum. A lise de hemácias na urina geralmente apresenta uma mistura de hemoglobinúria e hematúria. No caso de hemólise intravascular não serão encontradas hemácias na urina (KHADRA *et al.*, 2000; COHEN *et al.*, 2003; SUTTON, 1990). Em estudos anteriores, demonstrou-se presença de eritrócitos extravasculares ao redor dos capilares glomerulares e na cápsula de Bowman, danos ao glomérulo renal, sugerindo perda da integridade vascular. Não foi observada deposição de hemoglobina nas estruturas renais (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006), indicando que a nefrotoxicidade causada pelo veneno de *Loxosceles intermedia* não é decorrente de efeito hemolítico direto. A urinálise dos ratos submetidos ao tratamento com a toxina LiRecDT1 mostrou a presença de hemoglobinúria e hematúria. Ratos expostos ao veneno de *Loxosceles intermedia* apresentaram glicosúria, proteinúria, presença de eritrócitos na urina (hematúria) e hemoglobinúria, indicando o efeito nefrotóxico do veneno (COUTINHO, 1996). Análises por microscopia de luz de biópsias renais coletadas a partir de camundongos que receberam a toxina

dermonecrótica recombinante LiRecDT1 revelaram alterações incluindo presença de glóbulos vermelhos e colapso do espaço de Bowman, hialinização difusa com material protéico dentro do lúmen dos túbulos proximal e distal, e edema difuso das células epiteliais do túbulo proximal e distal comparado ao controle, porém não se identificou hemoglobínúria (KUSMA *et al.*, 2008).

A filtração glomerular atua como uma barreira seletiva para macromoléculas, em que proteínas de alta massa molecular são excluídas do filtrado. As proteínas menores são parcialmente filtradas, porém reabsorvidas no túbulo proximal. O filtro glomerular é composto por três camadas: camada de células endoteliais fenestradas, membrana basal glomerular e células epiteliais-podócitos (OBEIDAT *et al.*, 2012; HARA *et al.*, 2005). A principal característica funcional de lesão renal, tanto em humanos quanto no modelo animal, é a perda precoce de proteínas na urina, em especial a albumina. A presença de hematúria, hemoglobínúria e proteinúria indicam que há uma lesão na integridade da barreira responsável pela filtração glomerular. Dados de experimentação animal utilizando camundongos demonstraram elevada concentração de proteínas em urina dos animais tratados com LiRecDT1, hematúria, porém não houve presença de hemoglobínúria (KUSMA *et al.*, 2008). Em condições fisiológicas, proteínas de baixa massa molecular e uma pequena quantidade de albumina atravessam a barreira de filtração glomerular, mas são, em grande parte, reabsorvidas pelas células tubulares. Aumento na excreção de proteínas na urina pode ser decorrente de aumento de sua filtração, por alterações na permeabilidade seletiva glomerular, ou de defeitos em sua captação tubular. A filtração é dirigida por forças de Starling que atuam sobre a parede do capilar glomerular, e depende da sua área de superfície e alta permeabilidade à água. Células endoteliais glomerulares são extremamente planas e perfuradas por poros transcelulares, endotélio fenestrado. Um elaborado glicocálice, que cobre as células endoteliais glomerulares e suas fenestrações forma uma barreira que, em conjunto com outros componentes da parede capilar glomerular, impede a perda de proteínas do plasma para a urina (OBEIDAT *et al.*, 2012; BOHLE *et al.*, 1998; HARALDSSON *et al.*, 2009).

A creatinina e a ureia são provas de função renal (avaliam a função dos rins). A creatinina sérica foi significativamente aumentada em ratos tratados



com LiRecDT1 1,0 mg/kg após 12h de tratamento em comparação aos ratos do grupo controle (PBS). Dentre os marcadores de IRA, a depuração da creatinina sérica fornece uma estimativa da função glomerular. É um marcador padrão para a análise da função renal, produzida a uma taxa constante e é livremente filtrada (BAGSHAW *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2008; WAIKAR *et al.*, 2007). A sua concentração sérica depende da taxa de produção e do volume de distribuição corporal (LAMEIRE *et al.*, 2004). A concentração da creatinina no sangue de indivíduos normais é praticamente constante, apresentando uma variação em relação ao sexo e ao volume de massa muscular. Normalmente, sua excreção não é afetada pela dieta. Seus níveis sanguíneos aumentam à medida que ocorre a diminuição da filtração do sangue pelos rins. Por isso, é utilizada como marcador da função renal. A creatinina está aumentada na insuficiência renal (falência aguda e crônica dos rins).

Os valores de ureia estão aumentados nos casos de insuficiência renal (falência aguda e crônica dos rins), dieta rica em proteínas, tumores, infarto do miocárdio, trauma, infecções, uso de corticoesteróides, etc. A ureia é uma molécula endógena, hidrossolúvel e de baixa massa molecular que deriva do metabolismo protéico e constitui um marcador urêmico. Sua concentração sérica é modulada por fatores renais e extrarrenais, independentes da lesão/disfunção renal, sendo assim considerado apenas como um marcador auxiliar no diagnóstico da IRA. A taxa de produção de ureia não é constante e um aumento da ureia sérica pode resultar de condições extrarrenais como alimentação ou catabolismo proteico aumentado, hemorragia gastro-intestinal, trauma e terapia com glicocorticoides, sem que a função renal esteja diminuída (BAGSHAW *et al.*, 2008; URBSCHAT *et al.*, 2011).

Os dados aqui descritos e discutidos demonstram o envolvimento das fosfolipases D LiRecDT1 e LgRec1 na nefrotoxicidade desenvolvida após a picada da aranha-marrom. Pode-se afirmar que a nefrotoxicidade desencadeada pelas toxinas LiRecDT1 e LgRec1 deve-se à ação direta das toxinas sobre a membrana das células e essa ação é dependente da atividade enzimática das fosfolipases D. A ação das PLD's sobre a membrana das células renais humanas (HEK-293) induz um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Assim, a nefrotoxicidade desencadeada pelas

toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1 deve-se à ação destas sobre a membrana das células e ao processo inflamatório induzido pelas toxinas.

## 7. CONCLUSÃO

Por meio de técnica de PCR quantitativo tempo real foi possível determinar e quantificar a diferença de expressão dos genes referentes às citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e CXCL1 quando expostos às toxinas recombinantes LiRecDT1 e LgRec1, demonstrando que houve diferença significativa quando células HEK-293 foram expostas às toxinas recombinantes dermonecróticas.

A utilização de ensaio imunoenzimático (ELISA) para identificar a expressão de proteínas secretadas (*in vitro*) dos genes-alvo revelou aumento na expressão de proteínas para as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  após 6 horas de incubação com as toxinas LiRecDT1 e LgRec1 e veneno total de *L. intermedia*.

O ensaio de viabilidade celular revelou que houve diminuição da viabilidade das células quando expostas ao veneno total, LiRecDT1 e LgRec1 pelo método de exclusão do azul de Tripán.

A urinálise dos ratos submetidos ao tratamento com a toxina LiRecDT1 mostrou a presença de hemoglobinúria, hematúria, proteinúria e leucocitúria. Por meio de análises bioquímicas, foi possível demonstrar diferença significativa no nível de creatinina e uréia séricas nos ratos Wistar machos testados, indicando um comprometimento renal causado pela ação pela toxina LiRecDT1.

Ainda serão estudadas alterações histopatológicas e ultraestruturais em biópsias renais de ratos expostos a fosfolipase D de *L. intermedia* e veneno total por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

## REFERENCIAS

ABDULKADER, R.C., BARBARO, K.C., BARROS, E.J., BURDMANN, E.A. Nephrotoxicity of insect and spider venoms in Latin America. **Semin. Nephrol.** v.28, p. 373–382, 2008.

AHLSTROM, A.; HYNINEN, M.; TALLGREN, M.; KUUSELA, P.; VALTONEN, M.; ORKO, R.; SIITONEN, S.; TAKKUNEN, O.; PETTILA, V.. Predictive value of interleukins 6, 8 and 10, and low HLA-DR expression in acute renal failure. **Clin.Nephrol.**, v.61, p. 103-110, 2004.

ANLIKER, B.; CHUN, J. Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 20555-20558, 2004.

AKCAY, A., NGUYEN, Q., EDELSTEIN, C.L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. **Mediators inflamm**, p. 1-12, 2009.

APPEL, M. H., DA SILVEIRA, R. B., CHAIM, O. M., PALUDO, K. S., TREVISAN-SILVA, D., CHAVES, D. M., DA SILVA, P. H., MANGILI, O. C., SENFFRIBEIRO, A., GREMSKI, W., NADER, H. B. & VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780 p. 167-178, 2008.

BAGGIOLINI, DEWALD, B., MOSER, B. Human chemokines: An update. **Ann Rev Immunol**, v. 15, p. 675-705, 1997.

BAGSHAW, S., GIBNEY, R. Conventional markers of kidney function. **Crit Care Med**, v. 36, p. 152-1588, 2008.

BARBARO, K. C.; SOUSA, M. V.; MORHY, L.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spider of the genus *Loxosceles* (Araneae). **J Protein Chem**, v. 15, p. 337-343, 1996.

BARBARO, K. C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, p. 489-499, 2005.

BARBARO, K.C., M.S. Lira, C.A. Araújo, A. Pareja-Santos, B.C. Távora, J.P. Prezotto-Neto, L.F. Kimura, C. Lima, M. Lopes-Ferreira, M.L. Santoro, Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 56, p. 972-979, 2010.

BERRIDGE, M. J., LIPP, P., BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signaling. **Mol Cell Biol**, v. 1, p. 11-21, 2000.

BERTANI, R.; FUKUSHIMA, C. S.; NAGAHAMA, R. H. *Loxosceles chapadensis* (Araneae: Sicariidae): a new recluse spider species of the *gaucho* group from Brazil. **The Journal of the Arachnology**, v.38, p. 364-367, 2010.

A. BOHLE, B. AEIKENS, A. EENBOOM, L. FRONHOLT, W.R. PLATE, J.C. XIAO, A. GRESCHNIOK, M. WEHRMANN. Human glomerular structure under normal conditions and in isolated glomerular disease. **Kidney Int. Suppl**, v. 67, p.186–188, 1998.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, p. 441-447, 2006.

BOUVET, Y.; BOUISSOU, F.; COULAIS, Y.; SERONIE-VIVIEN, S.; TAFANI, M.; DECRAMER, S.; CHATELUT, E. GFR is better estimated by considering both serum cystatin C and creatinine levels. **Pediatr Nephrol**, v. 21, p. 1299-306, 2006.

BRADY H, SINGER G. Acute renal failure. **Lancet**, v. 346, p. 1533-40, 1995.

Cohen RA, Brow RS. Microscopic hematuria. **N Engl J Med**, v. 348, p. 2330-8, 2003.

COUTINHO, N.L.R. Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da “aranha marrom”, *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934).

**Dissertação de Mestrado em Morfologia, Biologia Celular.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

CRISTINA DE OLIVEIRA, K.; GONCALVES DE ANDRADE, R. M.; GIUSTI, A. L.; DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, v.37 p.217-221, 1999.

CHAIM, O. M., SADE, Y. B., DA SILVEIRA, R. B., TOMA, L., KALAPOTHAKIS, E., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., VON DIETRICH, C. P., NADER, H. B. & SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, p. 64-77, 2006.

CHAIM, O.M.; da SILVEIRA, R.B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V.P.; SADE, Y.B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **BBA Mol. Cell Biol. Lipids**, v. 1811, p. 84–96, 2011.

CHAIM, O.M., DA SILVEIRA, R.B., TREVISAN-SILVA, D., FERRER, V.P., SADE, Y.B., BÓIA-FERREIRA, M., GREMSKI, L.H., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., TAKAHASHI, H.K., TOLEDO, M.S., NADER, H.B., VEIGA, S.S. Phospholipase- D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1811, p. 84–96, 2011.

CHATZAKI, M.; HORTA, C. C.; ALMEIDA, M. O.; PEREIRA, N. B.; MENDES, T. M.; DIAS-LOPES, C.; GUIMARAES, G.; MORO, L.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; HORTA, M. C.; KALAPOTHAKIS, E. Cutaneous loxoscelism caused by

Loxosceles similis venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon**. v.60 p.21-30, 2012.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; da SILVEIRA, R.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J. Cell. Biochem.**, v. 107, p. 655–666, 2009.

CHISARI, A., SPINEDI, E., VOIROL, M.J., GIOVAMBATTISTA, A., GAILLARD, R.C. A phospholipase A2-related snake venom (from *Crotalus durissus terrificus*) stimulates neuroendocrine and immune functions: determination of different sites of action. **Endocrinology**, v. 139, p. 617-625, 1998.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Pathologic basis of disease. **Elsevier**, 1999.

R.B. Cunha, K.C. Barbaro, D. Muramatsu, F.C.V. Portaro, W. Fontes, M.V. Sousa, Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucha* brown spider venom, **J. Prot. Chem**, v. 22, p.135-146, 2003.

CUNNINGHAM, P. N.; DYANOV, H. M.; PARK, P. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. **Journal Immunol**, v. 168, p. 5817-5823, 2002.

DA SILVA, P.H., DA SILVEIRA, R.B., APPEL, M.H., MANGILI, O.C., GREMSKI, W., VEIGA, S.S. Brown spider and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, p. 693–709, 2004.

DA SILVEIRA, R.B., FILHO, J.F.S., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S., GREMSKI, W., NADER, H.B., 2002. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spider. **Toxicon**, v. 40, p. 815–822.

DA SILVEIRA, R. B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. & VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, p. 1241-1253, 2006.

DA SILVEIRA, R. B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., SILVA, D. T., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S. & GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, p. 289- 300, 2007.

DE ANDRADE, S. A., PEDROSA, M. F., DE ANDRADE, R. M., OLIVA, M. L., VAN DEN BERG, C. W. & TAMBOURGI, D. V. Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 327, p. 117-123, 2005.

DE CASTRO, C.S., SILVESTRE, F.G., ARAÚJO, S.C., GABRIEL, M.Y., MANGILI, O.C., CRUZ, I., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, p. 273-280, 2004.

DE OLIVEIRA, K.C., GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M., PIAZZA, R.M.F., FERREIRA JR., J.M.C., VAN DEN BERG, C.W., TAMBOURGI, D.V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, p. 421–429, 2005.

DE SOUZA, A.L., MALAQUE, C.M., SZTAJNBOK, J., ROMANO, C.C., DUARTE, A.J., SEGURO, A.C. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v. 51, p. 151–156, 2008.

DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **Eur J Immunol**, v. 37, p. 34–45, 2007.



DOOLAN, P.D.; ALPEN, E.L.; THEIL, G.B. A clinical appraisal of the plasma concentration and endogenous clearance of creatinine. **Am J Med**, v. 32, p. 65-72, 1962.

DRAGULEV, B., BAO, Y., RAMOS-CERRILLO, B., VAZQUEZ, H., OLVERA, A., STOCK, R., ALGARON, A. AND FOX, J. W. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis. **J Invest Dermatol**. v. 127, p. 1264-1266, 2007.

FEITOSA, L., GREMSKI, W., VEIGA, S. S., ELIAS, M. C., GRANER, E., MANGILI, O. C. AND BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1039-1051, 1998.

FERRER, V. P.; DE MARI, T. L.; GREMSKI, L. H.; TREVISAN SILVA, D.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's hyaluronidase): from cloning to functional characterization. **PloS Negl Trop Dis**, v. 7, p.2206, 2013.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, p.261-267, 1992.

FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; ABDULKADER, C.R.M.. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. **Trans.R. Soc. Med. Hyg**, v. 96, p. 287–290, 2002.

GERARD, C., ROLLINS, B. Chemokines and disease. **Nature Immunol**, v. 2, p. 108-115, 2001.

GEREN, C. R., CHAN, T. K., HOWELL, D. E. & ODELL, G. V. (1976). Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Arch Biochem Biophys** **174**: 90-99.

GEREN, C. R., CHAN, T. K., WARD, B. C., HOWELL, D. E., PINKSTON, K. & ODELL, G. V. (1973). Composition and properties of extract of fiddleback (*Loxosceles reclusa*) spider venom apparatus. **Toxicon**, v. 11, p. 471-479.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GIUSEPPE, P. O.; ULLAH, A.; TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; WILLW, A. C. M.; CHAVES-MOREIRA, D.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; MURAKAMI, M. T.; VEIGA, S.S.; ARNI, R. K. Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 409, p. 622- 627, 2011.

Gonçalves-de-Andrade, R.M., Bertani, R., Nagahama, R.H., Barbosa, M.F.R. *Loxosceles niedeguidonae* (Araneae, Sicariidae) a new species of brown spider from Brazilian semi-arid region. *Zookeys*, v. 175, p. 27–36, 2012.

GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; PROBST, C.M.; FERRER, V.P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**, v.6, p. 2403-2416, 2010.

GREMSKI, L.H.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MEISSNER, G. O.; WILLE, A. C. M.; VUITIKA, L.; DIAS-LOPES, C.; ULLAH, A.; MORAES, F. R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; BARBARO, K. C.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S.S. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v.83, p. 91-120, 2014.

GUELER, F., RONG, S., PARK, J.K., FIEBELER, A., MENNE, J., ELGER, M., MUELLER, D.N., HAMPICH, F., DECHEND, R., KUNTER, U., LUFT, F.C., HALLER, H. Posing acute renal failure is reduced by short-term statin treatment in a rat model. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, p. 2288-2298, 2002.

HANNUN, Y. A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide, **J. Biol. Chem.** **269** (1994) 3125–3128.

HARA, M.; YANAGIHARA, T.; HIGASHI, K.; FUJIMOTO, K.; KAJITA, T. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. **J AM Soc Nephrol**, v. 16, p. 408-416, 2005.

B. Haraldsson, M. Jeansson, Glomerular filtration barrier. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens**, v. 18, p. 331–335, 2009.

HILTON R. Defining acute renal failure. **CMAJ**, v. 183, p.1167-1169, 2011.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med**, v.44 p.608-624, 2004.

HORTA, C.C.R., OLIVEIRA-MENDES, B.B.R., CARMO, A.O., SIQUEIRA, F.F., BARROCA, T.M., LACERDA, S. M.S., CAMPOS, P.H.A., FRANÇA, L.R., FERREIRA, R.L., KALAPOTHAKIS, E. Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with Loxosceles Spider Venom. **J Invest Dermatol**, v. 133, p. 1682-1685, 2013.

HOSTETLER, M.A., DRIBBEN, W., WILSON, D.B., GROSSMAN, W.J. Sudden unexplained hemolysis occurring in an infant due to presumed Loxosceles envenomation. **J. Emerg. Med**, v. 25, p. 277–282, 2003.

HUBBARD, J.J., JAMES, L.P. Complications and outcomes of brown recluse spider bites in children. **Clin. Pediatr**, v. 50, p. 252–258, 2011.

HUGUET, J.L.B., NOVO, J.A.S., GUZMÁN, A.N. Picadura por *Loxosceles rufescens* (araña parda o del rincón). **FMC**, v. 19, p. 517–518, 2012.

ISBISTER, G. K.; WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. **Toxicon**, v. 43, p. 477- 492, 2004.

ISBISTER, G.K., FAN, H.W. Spider bite. **Lancet**, v. 378, p. 2039–2047, 2011.

JAIN, S.; BICKNELL, G.R.; NICHOLSON, M.L. Molecular changes in extracellular matrix turnover after renal ischaemia-reperfusion injury. **Br J Surg**, v.87, p. 1188–1192, 2000.

KALAPOTHAKIS, E., CHATZAKI, M., GONCALVES-DORNELAS, H., DE CASTRO, C. S., SILVESTRE, F. G., LABORNE, F. V., DE MOURA, J. F., VEIGA, S. S., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., GRANIER, C. & BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 938-946, 2007.

KHADRA, M.H.; PICKARD, R.S.; CHARLTON, M.; POWELL, P.H.; NEAL, D.E.. A prospective analysis of 1,930 patients with hematuria to evaluate current diagnostic practice. **J Urol**, v. 163, p. 524-527, 2000.

KIM, K.E.; ONESTI, G.; RAMIREZ, O. Creatinine clearance in renal disease. A reappraisal. **BMJ**, v.14, p. 11-19, 1969.

KOYNER J, VAIDYA V, BENNETT M, MA Q, WORCESTER E, AKHTER S, RAMAN, J., JEEVANANDAM, V., O’CONNO, M., DEVERAJAN, P., BONVENTRE, J., MURRAY, P.. Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. **Clin J Am Soc Nephrol** 5: 2154-2165, 2010.

KRASNA, N.E.T., KOLESAR, L., BRABCOVA, E., PETRICKOVA, K., PETRICEK, M., JARESOVA, M., SLAVCEV, A., STRIZ, I. CXC and CC chemokines induced in human renal epithelial cells by inflammatory cytokines. **APMIS**, v. 117, p. 477-487, 2009.

KUSMA, J.; CHAIM, O.M.; WILLE, A.C.M.; FERRER, V.; SADE, Y.B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, p. 1722- 1736, 2008.

LAMEIRE, N., HOSTE, E. Reflections on the definition, classification, and diagnostic evaluation of acute renal failure. **Curr Opin Crit Care**, v. 10, p. 468-75, 2004.

LARSSON, A.; MALM, J.; GRUBB, A.; HANSSON, L.O. Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg/dL. **Scand J Clin Lab Invest**, v.64, p. 25-30, 2004.

LEE, S., LYNCH, K.R., 2005. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem. J**, v. 391, p. 317–323.

LISOWSKA-MYJAK, B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. **Blood Purif**, v. 29, p. 357-65, 2010.

LUCATO JR, R. V.; ABDULKADER, R. C.; BARBARO, K. C.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; CURY, P. M.; MALHEIROS, D. M.; SCHOR, N.; YU, L.; BURDMANN, E. A. *Loxosceles gaucho* venom-induced acute kidney injury- *in vivo* and *in vitro* studies. **PLoS Negl. Dis.**, v.5, n.5, p.1-5, 2011.

LUCIANO, M. N., DA SILVA, P. H., CHAIM, O. M., DOS SANTOS, V. L., FRANCO, C. R., SOARES, M. F., ZANATA, S. M., MANGILI, O. C., GREMSKI, W. & VEIGA, S. S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles*

intermedia (brown spider) venom in renal tissue. **J Histochem Cytochem**, v. 52, p. 455-467, 2004.

LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Int. J. Dermatol**, v. 39, p. 287-289, 2000.

LUSTER, A. D. chemokines-chemotactic cytokines tha mediate inflammation. **N. engl. J med**, v. 338, p. 436-445, 1998.

C.M. Malaque, M. Ori, S.A. Santos, D.R. Andrade, Production of TNF-alpha by primary cultures of human keratinocytes challenged with *Loxosceles gaucho* venom. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 41, p. 179-182, 1999.

MALAUQUE, C. M.; SANTORO, M. L.; CARDOSO, J. L.; CONDE, M. R.; NOVAES, C. T.; RISK, J. Y.; FRANCA, F. O.; DE MEDEIROS, C. R.; FAN, H. W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**. v. 58 p.664-671, 2011.

Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa, M.V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v. 5, p. 2167-2176, 2005.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. [*Loxosceles Heineken* & *Lowe*, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana]. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.38 p.331-335, 2005.

MCDADE, J.; AYGUN, B.; WARE, R. E. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation leading to acute hemolytic anemia in six adolescents. **J Pediatr**, v.156 p.155-157, 2010.

MILLS, G. B. & MOOLENAAR, W. H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 3, p. 582-591, 2003.

MUNSHI, R., JOHNSON, A., SIEW, E.D., IKIZLER, T.A., WARE, L.B., WURFEL, M.M., HIMMELFARB, J., ZAGER, R.A. MCP-1 gene activation marks acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, p. 165-175, 2011.

MURAKAMI, M.T., FERNANDES-PEDROSA, M.F., DE ANDRADE, S.A., GABDOULKHAKOV, A., BETZEL, C., TAMBOURGI, D. V., ARNI, R. K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases, **Biochem Biophys Res Commun**, v. 342, p. 323–329, 2006.

MYERS, G.L.; MILLER, W.G.; CORESH, J.; FLEMING, J.; GREENBERG, N.; GREENE, T.; HOSTETTER, T.; LEVEY, A. S.; PANTEGHINI, M.; WELCH, M.; ECKFELDT, J. H. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. **Clin Chem**, v.52, p. 5-18, 2006.

NECHEMIA-ALBERLY, Y., BARKAN, D., PIZOV, G., SHRIKI, A., ROSE-JOHN, S., GALUN, E., AXELROD, J.H. IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, p. 1106-1115, 2008.

NGUYEN, M., DEVARAJAN, P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. **Pediatric nephrology**, v. 23, p. 2151-7, 2008.

NIEMIR, Z.I., STEIN, H., CIECHANOWICZ, A., OLEJNICZAK, P., DWORACKI, G., RITZ, E., WALDHERR, R., CZEKALSKI, S. The in situ expression of interleukin-8 in the normal human kidney and in different morphological forms of glomerulonephritis. **Am J Kidney Dis**, v. 43, p. 983-998, 2004.

NIEMIR, Z.I., STEIN, H., CIECHANOWICZ, A., OLEJNICZAK, P., DWORACKI, G., RITZ, E., WALDHERR, R., CZEKALSKI, S. The in situ expression of interleukin-8 in the normal human kidney and in different morphological forms of glomerulonephritis. **Am J Kidney Dis**, v. 43, p. 983-998, 2004.

OBEIDAT, M.; OBEIDAT, M.; BALLERMANN, B. J. Glomerular endothelium: A porous sieve and formidable barrier. **Exp Cell Res**, v. 318, p. 964-972, 2012.

ORTEGA, L.M., FORNONI, A. Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. **Int J of Interferon Cytokine Mediator Res**, v. 2, p. 49-62, 2010.

OSPEDAL, K. Z., APPEL, M. H., FILLUS NETO, J., MANGILI, O. C., SANCHES PALUDO, K. S.; BISCAIA, S. M.; CHAIM, O. M.; OTUKI, M. F.; NALIWAICO, K.; DOMBROWSKI, P. A.; FRANCO, C. R.; VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **CompBiochemPhysiol C Toxicol Pharmacol**, v.149, p.323-333, 2009.

PALUDO, K. S.; BISCAIA, S. M.; CHAIM, O. M.; OTUKI, M. F.; NALIWAICO, K.; DOMBROWSKI, P. A.; FRANCO, C. R.; VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, p. 323-333, 2009.

PETERSON, M. E. Brown spider envenomation. **Clin Tech Small Anim Pract**, v. 21, p. 191-193, 2006.

PETTUS, B. J., BIELAWSKA, A., SPIEGEL, S., RODDY, P., HANNUN, Y. A. AND CHALFANT, C. E. (2003) Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. **J Biol Chem**. **278**, 38206-38213.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 12.5. American Museum of Natural History, 2012. Disponível em: <  
<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO1.html>> acesso em:  
26/01/2012.



RATTMANN, Y. D., PEREIRA, C. R., CURY, Y., GREMSKI, W., MARQUES, M. C. A., SILVA-SANTOS, J. E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: Involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. **Toxicon**, v. 51, p. 363-372, 2008.

RIBEIRO, R. O., CHAIM, O. M., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, L. H., SADE, Y. B., PALUDO, K. S., SENFF-RIBEIRO, A., DE MOURA, J., CHAVEZOLORTEGUI, C., GREMSKI, W., NADER, H. B. & VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 1162-1174, 2007.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos Invertebrados. **Editora Roca**, 7 ed., 2005.

SADE, Y.B.; BOIA-FERREIRA,M.; GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Molecular cloning, heterologous Expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Biochem Cell Biol**, v.44, p.170-177, 2012.

Sams, H.H., Dunnick, C.A., Smith, M.L., King, L.E. Necrotic arachnidism. **J Am Acad Dermatol**, v. 44, 561–573, 2001.

SANCHEZ-NINO, M.D., BENITO-MARTIN, A., GONÇALVES, S., SANZ, A.B., UCERO, A.C., IZQUIERDO, M.C., RAMOS, A.M., BERZAL, S., SELGAS, R., RUIZ-ORTEGA, M., EGIDO, J., ORTIZ, A. TNF Superfamily: A growing saga of kidney injury modulators. **Mediators Inflamm**, 2010.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. [Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies]. **Rev Inst Med Trop S**, v.31 p.403-415, 1989.

SENFF-RIBEIRO, A., HENRIQUE DA SILVA, P., CHAIM, O. M., GREMSKI, L. H., PALUDO, K. S., BERTONI DA SILVEIRA, R., GREMSKI, W., MANGILI, O. C. & VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 210-218, 2008.

SHAIKH, P. Z. Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. **Int J of Pharm & Life Sci**, v. 2, p. 1247-1263, 2011.

SIMMONS, E.M., HIMMELFARB, J., SEZER, M.T., CHERTOW, G.M., MEHTA, R.L., PAGANINI, E.P., SOROKO, S., FREEDMAN, S., BECKER, K., SPRATT, D., SHYR, Y., IKIZLER, T.A. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. **Kidney Int**, v. 65, p. 1357–1365, 2004.

SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 4, p. 943-953, 2008.

SMITH, C.W. Adhesion molecules and receptors. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, p. 375-379, 2007.

SWENSSON, O., SCHUBERT, C., CHRISTOPHERS, E., SCHRODER, J.M. Inflammatory properties of neutrophil-activating protein-1/interleukin-8 (NAP-1/IL-8) in human skin: A light- and electron microscopic study. **J Invest Dermatol**, v. 96, p. 682-689, 1991.

SUTTON, JM. Evaluation of hematuria in adults. **JAMA**, v. 263, p. 2475-80, 1990.

SWANSON, D.L., VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clin. Dermatol**, v. 24, 213–221, 2006.

THADHANI R, PASCUAL M, BONVENTRE J. Acute renal failure. **N Engl J Med**, v. 334, p.1448-60, 1996.

TAMBOURGI, D. V., MAGNOLI, F. C., VAN DEN BERG, C. W., MORGAN, B. P., DE ARAUJO, P. S., ALVES, E. W. & DA SILVA, W. D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 251, p. 366-373, 1998.

TAMBOURGI, D.V., GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M., VAN DEN BERG, C.W. Loxoscelism: from basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, p. 1113–1119, 2010.

F.L. TAVARES, M.E. PEICHOTO, D. DE M. RANGEL, K.C. BARBARO, M.C. CIRILLO, M.L. SANTORO, I.S. SANO-MARTINS. *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. **Hum. Exp. Toxicol**, v. 30, p. 1567-1574, 2011.

F.L. TAVARES, M.C.C. SOUSA-E-SILVA, M.L. SANTORO, K.C. BARBARO, I.M.M. REBECCHI, I.S. SANO-MARTINS. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom, **Hum. Exp. Toxicol**, v. 23, p.477-486, 2004.

TSAGALIS, G. Update of acute kidney injury: intensive care nephrology. **Hippokratia**, p. 53-68, 2011.

VAIDYA, V.S., SHANKAR, K., LOCK, E.A., DIXON, D., MEHENDALE, H.M. Molecular mechanisms of renal tissue repair in survival from acute renal tubule necrosis: Role of ERK1/2 pathway. **Toxicol Pathol**, v. 31, p. 604–618, 2003.

VAN MEETEREN, L. A., FREDERIKS, F., GIEPMANS, B. N., PEDROSA, M. F., BILLINGTON, S. J., JOST, B. H., TAMBOURGI, D. V. AND MOOLENAAR, W. H. (2004) Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **J Biol Chem**, v. 279, p. 10833-10836.

VEIGA, S.S.; SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, p. 825–839, 2000.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, p. 843-850, 2001.

VETTER, R.S.; ISBISTER, G.K. Medical aspects of spiders bites. **Ann Rev of Entomol.**, v. 53, p. 409-429, 2008.

VUITIKA, L.; GREMSKI, L. H.; BELISARIO, M.; CHAVES-MOREIRA, D.; FERRER, V. P.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site. **J Cell Biochem**, v. 114, p. 2479-2492, 2013.

WAIKAR, S., BONVENTRE, J. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 16, p. 557-64, 2007.

WILLE, A. C. M.; CHAVES-MOREIRA, D.; TREVISAN-SILVA, D.; MAGNONI, M. G.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 67, p. 17-30, 2013.

WILLIAMS, S.T.; KHARE, V.K.; JOHNSTON, G.A.; BLACKALL, D.P. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. **Am J Clin Pathol**, v. 104, p. 463-467, 1995.

WRIGHT, S. W.; WRENN, K. D.; MURRAY, L.; SEGER, D. Clinical presentation and outcome of brown recluse spider bite. **Ann Emerg Med**, v.30 p.28-32, 1997.

W.H. MOOLENAAR, L.A. VAN MEETEREN, B.N. GIEPMANS. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling, **Bioessays**, v. 26, p. 870–881, 2004.

ZAGER, R. A., JOHNSON, A.C.M., LUND, S., HANSON, S. Acute renal failure: determinants and characteristics of the injury-induced hyperinflammatory response. **Am J Physiol Renal**, v. 291, p. 546-556, 2006.